

**UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE FARMÁCIA**



**Vencendo a multi-resistência:  
Modelos computacionais da Glicoproteína-P**

Ricardo José Diogo Grácio Ferreira

**Mestrado em  
Química Farmacêutica e Terapêutica  
2011**





**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



**Vencendo a multi-resistência:  
Modelos computacionais da Glicoproteína-P**

Ricardo José Diogo Grácio Ferreira

Tese orientada por  
Doutora Rita C. Guedes  
Doutor Daniel J.V.A. dos Santos

**Mestrado em  
Química Farmacêutica e Terapêutica  
2011**



Esta tese foi integralmente efectuada  
nas instalações de Química Computacional do  
Research Institute for Medicines and  
Pharmaceutical Sciences (iMed.UL) da  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa,



*Para a Cátia e Leonor*

*Dedico esta tese*

*à minha esposa e filha,*

*agradecendo a paciência,*

*motivação e infindável apoio,*

*que me deram ânimo mesmo*

*nos momentos mais difíceis.*



*Agradeço a oportunidade de participar neste projecto à Professora Doutora Maria José U. Ferreira, aos meus orientadores de tese, Doutora Rita C. Guedes e Doutor Daniel J.V.A. dos Santos, ao Professor Doutor Rui Moreira, coordenador do grupo de Química Medicinal do iMed.UL e a todos os que contribuíram para o desenvolvimento desta tese. Agradeço igualmente à Fundação para a Ciência e Tecnologia o financiamento através do qual foi possível a realização do trabalho descrito (Projecto PTDC/QUI-QUI/099815/2008).*





## ÍNDICE

<b>Índice de Tabelas</b>	<b><i>pág. xiii</i></b>
<b>Índice de Esquemas</b>	<b><i>pág. xiii</i></b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b><i>pág. xiii</i></b>
<b>Índice de Gráficos</b>	<b><i>pág. xv</i></b>
<b>Abreviaturas</b>	<b><i>pág. xvii</i></b>
<b>Resumo</b>	<b><i>pág. xxi</i></b>
<b>Palavras-Chave</b>	<b><i>pág. xxii</i></b>
<b>Abstract</b>	<b><i>pág. xxv</i></b>
<b>Keywords</b>	<b><i>pág. xxvi</i></b>
<b>Capítulo I – Introdução</b>	
1.1. O cancro e a multi-resistência aos anti-tumorais	<i>pág. 3</i>
1.2. A Glicoproteína-P	<i>pág. 5</i>
Referências	<i>pág. 11</i>
<b>Capítulo II – Desenvolvimento do Farmacóforo</b>	
2.1. Introdução	<i>pág. 17</i>
2.2. Metodologia	<i>pág. 24</i>
2.2.1. Criação das bases de dados	<i>pág. 24</i>
2.2.2. Optimização molecular	<i>pág. 25</i>
2.2.3. Obtenção de farmacóforos	<i>pág. 25</i>
2.2.3.1. Elucidação farmacofórica	<i>pág. 25</i>
2.2.2.2. Alinhamento flexível com consenso farmacofórico	<i>pág. 25</i>
2.3. Validação do método de construção do farmacóforo	<i>pág. 26</i>
2.3.1. Construção do farmacóforo derivado dos análogos da reserpina	<i>pág. 26</i>
2.3.2. Construção do farmacóforo derivado dos inibidores da proteína Cinase C	<i>pág. 27</i>
2.3.3. Construção de farmacóforos com base em compostos da literatura	<i>pág. 29</i>
2.3.4. Construção do farmacóforo com base nos moduladores isolados do género <i>Euphorbia</i>	<i>pág. 32</i>
2.3.5. <i>Screening</i> Virtual	<i>pág. 38</i>

2.4. Discussão dos Resultados	pág. 39
Referências	pág. 42
<b>Capítulo III – Simulação Computacional da Glicoproteína-P</b>	
3.1. Introdução	pág. 49
3.2. Metodologia	pág. 53
3.2.1. Estruturas iniciais e <i>software</i>	pág. 53
3.2.2. Parâmetros das simulações	pág. 53
3.2.3. Construção dos sistemas membranares	pág. 54
3.2.4. Inserção inicial da proteína na membrana	pág. 54
3.2.5. Construção da sequência de ligação	pág. 55
3.2.6. Adição e equilíbrio da sequência na proteína	pág. 56
3.2.7. Condições das corridas de produção	pág. 56
3.3. Resultados das simulações de Dinâmica Molecular	pág. 56
3.3.1. Simulação inicial da proteína	pág. 56
3.3.2. Inserção da proteína em DMPC e posterior avaliação	pág. 58
3.3.3. Construção e equilíbrio do segmento intermédio	pág. 62
3.3.4. Equilíbrio e avaliação da estrutura total.	pág. 65
3.3.5. Análise das corridas de produção	pág. 70
3.4. Discussão dos Resultados	pág. 82
Referências	pág. 84
<b>Capítulo IV - Conclusões e Perspectivas Futuras</b>	pág. 91

#### **Anexo I**

##### **Informação de suporte sobre o Desenvolvimento do Farmacóforo**

#### **Anexo II**

##### **Informações de suporte sobre a Simulação Computacional da Glicoproteína-P**

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Mecanismos propostos para a resistência aos fármacos anti-tumorais	<i>pág. 5</i>
<b>Tabela 2</b>	Farmacóforos resultantes de vários ensaios 3D-QSAR.	<i>pág. 20</i>
<b>Tabela 3</b>	Percentagens de detecção para cada farmacóforo desenvolvido. N é o número de compostos em cada base de dados, PKC é proteína Cinase C.	<i>pág. 26</i>
<b>Tabela 4</b>	Percentagens de detecção, pelo farmacóforo de quatro pontos, de novas moléculas presentes na base de dados do MOE 2009.10. N é o número de compostos total da base de dados.	<i>pág. 39</i>
<b>Tabela 5</b>	Comparação das propriedades no final das corridas de produção das diferentes membranas de 512 lípidos ( $A_L$ , área por lípido; $V_L$ , volume por lípido).	<i>pág. 59</i>
<b>Tabela 6</b>	Propriedades finais da membrana lipídica com a parametrização CHARMM27.	<i>pág. 68</i>

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b>	Ciclo catalítico da P-gp proposto por Senior <i>et al.</i> (A) e por Callaghan <i>et al.</i> (B).	<i>pág. 9</i>
<b>Esquema 2</b>	Esqueleto diterpénico da molécula dos latiranos utilizados no desenvolvimento do farmacóforo proposto.	<i>pág. 32</i>
<b>Esquema 3</b>	Valores dos raios, distâncias, ângulos e ângulo diedro do farmacóforo desenvolvido a partir do esqueleto latirano.	<i>pág. 33</i>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema bidimensional da P-gp. As linhas a tracejado indicam os limites da membrana celular; o segmento a vermelho corresponde à sequência de ligação entre as duas unidades.	<i>pág. 5</i>
<b>Figura 2</b>	Mecanismos propostos para o modo de funcionamento da P-gp.	<i>pág. 7</i>
<b>Figura 3</b>	Farmacóforo proposto por Pierce <i>et al.</i> com dois pontos aromáticos (laranja) e um dador de electrões (azul).	<i>pág. 17</i>
<b>Figura 4</b>	Exemplos de farmacóforos derivados de diferentes estruturas.	<i>pág. 19</i>
<b>Figura 5</b>	Farmacóforos obtidos para quinazolinonas (A) e para o tariquidar (B). Verde – hidrofóbico; azul – aceitador de pontes	

	de hidrogénio; violeta – dador de pontes de hidrogénio; vermelho – catiónico.	pág. 22
<b>Figura 6</b>	Exemplos de moléculas de origem natural com actividade moduladora. A, jatrofanos; B, latiranos; C, cucurbitanos; D, ginsenosídeos; E, sifolanos; F, taxanos.	pág. 23
<b>Figura 7</b>	Farmacóforo derivado dos análogos da reserpina. F1, aromático; F2, dador/hidrofóbico; F3, aceitador/hidrofóbico; F4, aromático/hidrofóbico.	pág. 27
<b>Figura 8</b>	Farmacóforo derivado dos inibidores da PKC sobreposto na molécula de K252-a. F1, aromático/hidrofóbico; F2, hidrofóbico; F3, aromático/hidrofóbico; F4, aceitador.	pág. 28
<b>Figura 9</b>	OC144-093 com o farmacóforo A. Os pontos farmacofóricos F1, F2 e F5, hidrofóbicos; F4, aromático; F3, hidrofóbico/aceitador de pontes de hidrogénio.	pág. 30
<b>Figura 10</b>	Sobreposição da molécula de doxorubicina no farmacóforo B. F1, hidrofóbico/aromático; F2 e F5, pontos hidrofóbicos; F3 e F4, pontos aceitadores.	pág. 31
<b>Figura 11</b>	Conformações de menor desvio quadrático médio detectadas pelo presente farmacóforo (em cima) e diagrama esquemático da área de reconhecimento definida pelo farmacóforo.	pág. 35
<b>Figura 12</b>	Conformações de RMSD mais baixas do verapamil com um ponto farmacofórico aceitador (azul-claro, à esquerda) ou catiónico (azul-escuro, à direita).	pág. 38
<b>Figura 13</b>	Estruturas detectadas através da técnica de <i>screening virtual</i> com recurso ao farmacóforo desenvolvido, e correspondente RMSD.	pág. 39
<b>Figura 14</b>	Representação do POPC de acordo com o modelo "all-atom" (A), "united-atom" (B) e "coarse-grained" (C).	pág. 51
<b>Figura 15</b>	Representações finais das corridas de produção (30 ns) em DMPC e respectivo ângulo de inclinação da proteína (A - Berger <i>et al.</i> ; B - Kukol; C - Poger <i>et al.</i> ).	pág. 59
<b>Figura 16</b>	Estrutura secundária inicial do segmento intermédio, indicando os aminoácidos inicial e terminal.	pág. 63
<b>Figura 17</b>	Estruturas secundárias após a corrida de equilibração das simulações 2, 4, 5 e 7.	pág. 64
<b>Figura 18</b>	Estrutura secundária final após a corrida de equilibração do	

	segmento intermédio.	pág. 66
<b>Figura 19</b>	Estruturas finais (A) com indicação dos resíduos em zona proibida do gráfico de Ramachandran final (B) e energias de contacto finais (C) para as simulações P1 (esquerda) e C1 (direita).	pág. 72
<b>Figura 20</b>	Estruturas finais (A) com indicação dos resíduos em zona proibida do gráfico de Ramachandran final (B) e energias de contacto finais (C) para as simulações P2 (esquerda) e C2 (direita).	pág. 74

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Distribuição das percentagens das moléculas não detectadas (informação adicional sobre os subgrupos incluído no <i>Anexo I</i> ).	pág. 33
<b>Gráfico 2</b>	Impacto na percentagem de detecção com a modificação do ponto aceitador de pontes de hidrogénio por um dador, aromático, catiónico ou dador/aceitador.	pág. 36
<b>Gráfico 3</b>	Impacto nas percentagens de detecção com a adição de um quinto ponto farmacofórico.	pág. 37
<b>Gráfico 4</b>	Gráfico de Ramachandran da estrutura inicial (A) e final (B) em água.	pág. 56
<b>Gráfico 5</b>	Desvio quadrático médio (RMSD) e raio de giração (GYR) da simulação da proteína cristalográfica em água.	pág. 57
<b>Gráfico 6</b>	RMSD da corrida de produção (30 ns) com a proteína inserida numa membrana de DMPC nas diferentes parametrizações FF1, Berger <i>et al.</i> ; FF2, Kukol; FF3, Poger <i>et al.</i> ; [●], resultado para o POPC com a parametrização FF3.	pág. 59
<b>Gráfico 7</b>	Raio de giração (GYR) da corrida de produção (30 ns) com a proteína inserida numa membrana de DMPC nas diferentes parametrizações FF1, Berger <i>et al.</i> ; FF2, Kukol; FF3, Poger <i>et al.</i> ; [●], resultado para o POPC com a parametrização FF3.	pág. 61
<b>Gráfico 8</b>	Perfis dos parâmetros de deutério, indicadores da organização das cadeias hidrofóbicas, acompanhados dos respectivos valores experimentais.	pág. 61
<b>Gráfico 9</b>	Energias médias das corridas de equilibração do segmento intermédio.	pág. 63
<b>Gráfico 10</b>	Evolução do RMSD dos segmentos.	pág. 65

<b>Gráfico 11</b>	Evolução do GYR dos segmentos.	<i>pág. 65</i>
<b>Gráfico 12</b>	Desvio quadrático médio das simulações contendo a proteína total, destinadas a avaliar a influência do segmento intermédio.	<i>pág. 67</i>
<b>Gráfico 13</b>	Raio de giração das simulações contendo a proteína total, destinadas a avaliar a influência do segmento intermédio.	<i>pág. 67</i>
<b>Gráfico 14</b>	Perfis dos parâmetros de deutério, indicadores da organização das cadeias hidrofóbicas, acompanhados dos respectivos valores experimentais.	<i>pág. 69</i>
<b>Gráfico 15</b>	RMSD das simulações P1 e C1.	<i>pág. 70</i>
<b>Gráfico 16</b>	GYR das simulações P1 e C1.	<i>pág. 71</i>
<b>Gráfico 17</b>	RMSD para as simulações P2 e C2.	<i>pág. 73</i>
<b>Gráfico 18</b>	GYR para as simulações P2 e C2.	<i>pág. 73</i>
<b>Gráfico 19</b>	Variação da distância mínima entre os aminoácidos envolvidos na formação de pontes de hidrogénio 'linker'/NBD, na simulação P2.	<i>pág. 75</i>
<b>Gráfico 20</b>	Variação da distância mínima entre os aminoácidos envolvidos na formação de pontes de hidrogénio 'linker'/NBD, na simulação C2.	<i>pág. 76</i>
<b>Gráfico 21</b>	Comparação dos RMSF dos resíduos para as diferentes simulações.	<i>pág. 77</i>
<b>Gráfico 22</b>	RMSD dos diferentes componentes da P-gp na simulação P2.	<i>pág. 78</i>
<b>Gráfico 23</b>	Evolução da organização da estrutura secundária ao longo do tempo, para as simulações P2 e C2.	<i>pág. 79</i>
<b>Gráfico 24</b>	Densidades dos diversos componentes do sistema para os campos de força GROMOS96 (P2) e CHARMM27 (C2).	<i>pág. 80</i>
<b>Gráfico 25</b>	Área global acessível pelo solvente (SAS) para as simulações P1 e P2.	<i>pág. 81</i>
<b>Gráfico 26</b>	Área global acessível pelo solvente (SAS) para as simulações C1 e C2.	<i>pág. 81</i>

## ABREVIATURAS

<b>3D-QSAR</b>	relação estrutura-actividade a três dimensões
<b>Å</b>	Ångström
<b>ACC</b>	aceitador de pontes de hidrogénio
<b>ADP</b>	adenosina difosfatada
<b>A<sub>L</sub></b>	área por lípido
<b>AMP</b>	adenosina monofosfatada
<b>Arg</b>	arginina
<b>ARO</b>	aromático
<b>Asn</b>	asparagina
<b>Asp</b>	ácido aspártico
<b>ATP</b>	adenosina trifosfatada
<b>ATPase</b>	hidrolase da adenosina trifosfatada
<b>bar</b>	unidade de pressão, equivalente a 0,987 atmosferas
<b>BCRP</b>	Proteína 1 de resistência do cancro da mama
<b>BRCA1</b>	cancro de mama 1, aparecimento precoce
<b>BtuCD</b>	<i>Escherichia coli</i> transportador ABC BtuCD
<b>Ca</b>	cálcio
<b>Caco-2</b>	linha celular do adenocarcinoma do cólon
<b>CCl<sub>4</sub></b>	tetracloro de carbono
<b>COO<sup>-</sup></b>	anião carboxilato
<b>Cys</b>	cisteína
<b>DBS</b>	local de ligação aos substratos
<b>DMPC</b>	dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>DON</b>	dador de pontes de hidrogénio
<b>DPPC</b>	dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina
<b>Glu</b>	ácido glutâmico
<b>GYR</b>	raio de giração
<b>HB</b>	pontes de hidrogénio

<b>His</b>	histidina
<b>HYD</b>	hidrofóbico
<b>K</b>	graus Kelvin
<b>kDa</b>	quiloDaltons
<b>Leu</b>	leucina
<b>LLC-PK1</b>	linha celular de rim de porco
<b>Lys</b>	lisina
<b>MDR</b>	multi-resistência
<b>MDR1</b>	gene da multi-resistência 1
<b>MDR2</b>	<i>multidrug resistance protein 2</i>
<b>Mg</b>	magnésio
<b>MMFF94x</b>	Campo de forças Merck Molecular 94x
<b>MRP1</b>	proteína da multi-resistência 1
<b>MsbA</b>	<i>Salmonella enterica</i> flipase lipídica MsbA
<b>NBD</b>	domínio de ligação a nucleótidos
<b>NBD-Cl</b>	7-cloro-4-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazole
<b>NBD1</b>	domínio de ligação aos nucleótidos 1
<b>NEM</b>	N-etilmaleimida
<b>NH<sub>3</sub><sup>+</sup></b>	catião amónio
<b>nm</b>	nanómetro
<b>NO<sub>2</sub></b>	grupo nitro
<b>NPT</b>	simulação com número de átomos, pressão e temperatura constantes
<b>ns</b>	nanossegundo
<b>NVT</b>	simulação com número de átomos, volume e temperatura constantes
<b>P-gp</b>	glicoproteína-P
<b>PBC</b>	condições de fronteira periódicas
<b>pH</b>	potencial de hidrogénio
<b>PKC</b>	proteína cinase C
<b>PME</b>	<i>Particle Mesh Ewald</i>
<b>POPC</b>	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina
<b>ps</b>	picossegundo



<b>RMS</b>	valor quadrático médio
<b>RMSD</b>	desvio quadrático médio
<b>SAS</b>	área acessível pelo solvente
<b>Sav1866</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> transportador ABC da multi-resistência Sav1866
<b>SBHR</b>	região de ligação de hormonas esteróides
<b>Ser</b>	serina
<b>Thr</b>	treonina
<b>TMD</b>	domínio transmembranar
<b>Val</b>	valina
<b>V<sub>L</sub></b>	volume por lípido



## Resumo

O cancro é actualmente uma das doenças com maior prevalência, constituindo um dos maiores desafios da Medicina no século actual. Apesar dos avanços no tratamento médico e farmacológico algumas formas mais agressivas de cancro desenvolvem resistência a múltiplos fármaco (multi-resistência, ou MDR), muitas vezes relacionada com o aumento da expressão da Glicoproteína-P (P-gp) à superfície das células cancerígenas. A expressão aumentada deste transportador contribui para o fracasso dos tratamentos farmacológicos, fazendo com que o desenvolvimento de moduladores (também conhecidos como reversores da multi-resistência ou inibidores) seja uma das estratégias mais promissoras no combate a este fenómeno.

A P-gp é uma proteína transmembranar da família dos transportadores ABC, identificado na MDR desde a década de 1970. Vários estudos demonstraram que a inibição desta bomba de efluxo em particular poderia reverter o fenómeno de resistência a múltiplos fármacos em linhas celulares resistentes a múltiplos fármacos. Devido à ubiquidade dos substratos transportados e à ausência de uma estrutura cristalográfica da P-gp até 2009, o desenvolvimento de moduladores foi severamente comprometida, permitindo no entanto o desenvolvimento e publicação de estudos focando o desenvolvimento de farmacóforos, contribuindo para uma melhor compreensão das principais características necessárias para uma modulação eficaz da sua actividade. No entanto, a maioria dos farmacóforos publicados foram desenvolvidos a partir de moléculas com uma variação estrutural limitada, não sendo capazes de detectar moduladores obtidas a partir da espécie do género *Euphorbia* pelo grupo de Produtos Naturais, sob coordenação do Prof. Maria José U. Ferreira.

Desde 2009 que se encontra disponível no *Protein Data Bank* estruturas cristalográficas da P-gp murina, homóloga da P-gp humana em 89% da sua estrutura. Devido à enorme homologia entre as duas proteínas, são de uma importância fulcral na realização de estudos de homologia, evitando muitos dos problemas detectados por estudos anteriores que utilizaram como modelo transportadores bacterianos. No entanto, a baixa resolução da estrutura e a ausência de um importante segmento intermédio não permite a sua utilização directa. Através do recurso a técnicas de simulação computacional, a sequência em falta pode ser modelada e inserida na estrutura, permitindo a avaliação da estrutura

completa em termos de estabilidade estrutural e acerca da importância do ambiente hidrofóbico no mecanismo de acção do transportador.

A partir de farmacóforos e dados disponíveis na literatura e com base em diterpenos macrocíclicos isolados a partir de espécies do género *Euphorbia*, foi efectuado um estudo das características farmacofóricas mais importantes, tendo sido obtido um novo e melhorado farmacóforo de quatro pontos que permite a detecção de um espectro mais amplo de moduladores, mantendo uma elevada precisão na detecção de moléculas sem actividade. Foi determinada a importância dos grupos hidrofóbicos e aceitadores de pontes de hidrogénio como características essenciais para o reconhecimento de diferentes moléculas pela P-gp, bem como a combinação de diferentes características e a sua influência na taxa de detecção e os estados de protonação dos grupos amina.

Com os estudos de dinâmica molecular, e através da utilização de diferentes metodologias e campos de força, foi possível obter uma estrutura final equilibrada e novos dados relevantes acerca da importância da membrana lipídica e da sequência cristalográfica omissa, contribuindo desta forma para uma melhor compreensão da estrutura deste tipo de transportador.

### **Palavras chave**

diterpenos macrocíclicos, glicoproteína-P, farmacóforo, multi-resistência, química computacional, dinâmica molecular;





## Abstract

Cancer is one of the most prevalent and challenging diseases in the current century. Despite the advances in medical and in pharmacological treatment, some types of cancer develop multidrug resistance, often related to the increased expression of P-glycoprotein (P-gp) by cancer cells, thus contributing for the failure of chemotherapeutic treatments, making the development of P-gp modulators (also known as MDR reversers, inhibitors or chemosensitizers) one of the most promising strategies to overcome MDR.

P-gp is a member of ABC transporters that is known since 1970's. Several studies demonstrated that the inhibition of this particular efflux pump could reverse the multidrug phenomenon in multidrug resistant cell lines. Due to the ubiquity of the transported substrates and to the absence of a crystallographic structure until 2009, the development of modulators was severely impaired, which allowed the publication of studies focusing the development of pharmacophores, therefore contributing to a better understanding of the key features needed to a successful modulation of the P-gp activity. However, most of the published pharmacophores were developed from molecules with limited structural variation, not being able to detect modulators obtained in-house from *Euphorbia* species by the Natural Products group, under coordination of Prof. Maria José U. Ferreira.

Since 2009 that is available in the Protein Data Bank the crystallographic structure of murine P-gp. This structure shares a 89% similarity with human P-gp and is suitable for homology modeling studies, avoiding some of the problems faced by previous studies that were based in bacterial transporters and later proved inaccurate. Nevertheless, the low resolution of the structure and the absence of an important intermediate segment does not allow the use of the data in subsequent studies. Through computational simulation, the missing sequence can be constructed and inserted in the structure and the complete transporter can be evaluated, regarding the stability of the secondary structure and the importance of the lipid environment in the transporters mechanism of action.

Based on pharmacophores and data already published and focusing in macrocyclic diterpenes isolated from *Euphorbia* species, a comprehensive study on pharmacophore features was performed, obtaining a new and improved four-point pharmacophore able to detect a broader spectrum of modulators, but simultaneously specific enough to avoid

the detection of non-active molecules. It is clarified the importance of the hydrophobic and electron acceptor moieties as essential features for recognition of different molecules by the P-gp drug-binding site, also accessing the best combination of the different pharmacophoric moieties and evaluating the amine groups protonation states.

Regarding the computational studies, through the utilization of different methodologies and comparing the results in several force fields, some final and equilibrated structures could be obtained, providing new data on the importance of the lipid bilayer and the missing crystallographic sequence and contributing to the better understanding of the structure for this type of transporter.

**Keywords**

macrocyclic diterpenes, multidrug resistance, computational chemistry, P-glycoprotein, pharmacophore, molecular dynamics;



# *Capítulo I*

## *Introdução*



**1.1 O cancro e a multi-resistência aos anti-tumorais.** O cancro foi considerado uma das doenças com maior prevalência na primeira década do século XXI. Foram registados mais de 12 milhões de novos casos no ano de 2008, estimando-se o aumento para perto de 17 milhões de novos casos por ano em 2020<sup>1</sup>. De todos os casos registados a nível mundial, uma percentagem superior a 50% terminam com a morte do paciente, contribuindo deste modo para 10% do total de óbitos a nível mundial<sup>1,2</sup>.

O fenómeno da carcinogénese é frequentemente classificado como uma alteração no controlo do crescimento de células ou tecidos, no qual os mecanismos que regulam o ciclo de crescimento, multiplicação e/ou diferenciação celular se encontram alterados ou em muitos casos totalmente inactivos. A prevenção, através da adopção de estilos de vida saudáveis, em conjunto com a detecção precoce de neoplasias são armas poderosas no tratamento do cancro, porque o diagnóstico e tratamento nas fases iniciais possui um prognóstico com uma evolução mais favorável. Se a detecção do tumor ocorrer nos estadios III ou IV, o tratamento tende a tornar-se mais difícil e agressivo, sobretudo se estiverem presentes neoplasias secundárias (metástases)<sup>2,3</sup>.

O mecanismo molecular subjacente à génese tumoral reside no aparecimento de mutações em genes específicos como os genes supressores de tumores, proto-oncogenes ou genes que promovem a reparação do DNA<sup>2</sup>. Estas mutações podem surgir espontaneamente ou o seu aparecimento pode ser induzido por exposição a agentes carcinogénicos, químicos ou biológicos. No entanto, estudos demonstraram igualmente a existência de uma predisposição genética no aparecimento de determinados tumores, cujo melhor exemplo é o cancro da mama, frequentemente associado à presença de ambas as cópias do gene *BRCA1* no genoma celular<sup>4,5</sup>.

Actualmente, a terapêutica anti-tumoral assenta num carácter multidisciplinar, sendo constituída por três valências principais e complementares. A *cirurgia* é utilizada quando o tumor é detectado precocemente ou quando este possui dimensões e limites bem definidos, sem invasão dos tecidos adjacentes. A *radioterapia* e *quimioterapia* são frequentemente utilizadas no pré- e pós-operatório por forma a garantir a erradicação de células cancerígenas que, não tendo sido removidas pela cirurgia, tenham permanecido no local ou metastizado noutros tecidos do organismo, mas cuja quantidade não é suficiente para a sua detecção eficaz pelos métodos de diagnóstico<sup>3</sup>. Enquanto que a

radioterapia emprega radiação de alta energia para induzir quebras na dupla hélice do DNA, os agentes farmacológicos utilizados na quimioterapia possuem a capacidade de inibir a proliferação celular, por interacção directa com o DNA ou por interferência nos sistemas de transducção de sinal. Com a interrupção da divisão celular, o crescimento tumoral é reduzido devido à activação de processos de morte celular das células cancerígenas<sup>2</sup>.

Existem, contudo, restrições na utilização de fármacos anti-tumorais. A principal limitação deriva da toxicidade intrínseca que impede o seu uso clínico prolongado. Por forma a contornar este problema, a quimioterapia é frequentemente administrada em ciclos, separados por um intervalo de tempo adequado que favorece a recuperação das células não alteradas, com ou sem recurso a medicação adicional. Outro factor importante é a concentração efectiva alcançada pelo fármaco no local de acção. Esta concentração é condicionada por determinantes biológicos (tipo e localização da neoplasia, irrigação do local), farmacocinéticos (forma farmacêutica, dose e intervalo de administração) e químicos (pH, solubilidade) que influenciam a magnitude e intensidade da resposta, sendo esta proporcional aos mecanismos subjacentes que promovem o crescimento tumoral<sup>4,6</sup>.

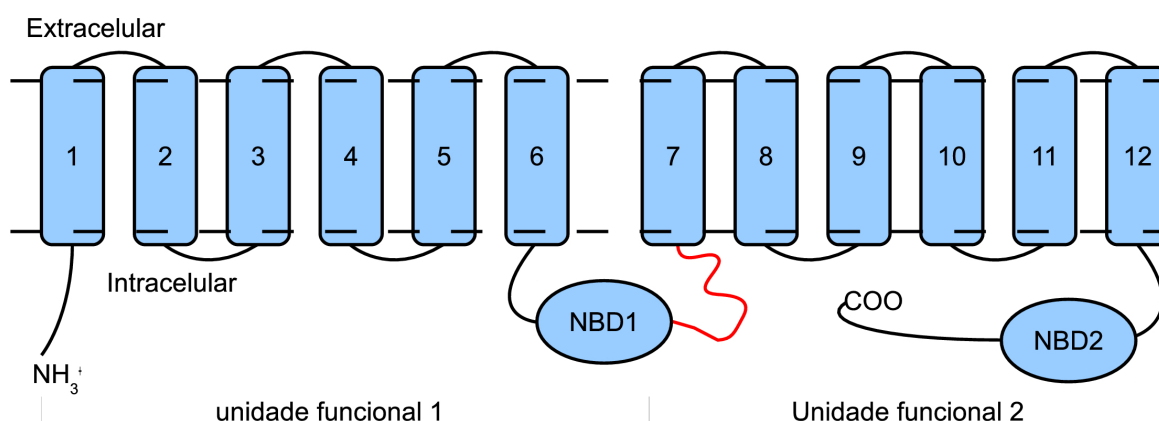
Mesmo após a consideração ponderada de todos os factores enunciados, têm-se verificado desde as últimas décadas do século passado um progressivo aumento da resistência à acção dos medicamentos anti-tumorais através de duas componentes principais designadas por *Intrínseca* e *Adquirida*<sup>3</sup>. Enquanto que na *Intrínseca* a resistência à quimioterapia ocorre desde as fases iniciais do tratamento, na *Adquirida* as células apresentam uma perda gradual de sensibilidade, devido à eliminação das células sensíveis em detrimento das resistentes aos fármacos utilizados. A resistência apresentada pelas células tumorais pode não ser exclusiva de apenas um fármaco, mas incluir várias moléculas com mecanismos de acção distintos, sendo então designada de multi-resistência (*MDR*). Este facto é frequentemente relacionado com a sobre-expressão de uma família de proteínas transmembranares designada por transportadores ABC, que inclui até ao presente momento 13 membros distintos<sup>7</sup> dos quais o mais representativo é a Glicoproteína-P (P-gp), codificada na espécie humana pelo gene *ABCB1*. A **Tabela 1** sistematiza alguns dos mecanismos descritos na literatura que visam explicar o fenómeno da resistência.

**Tabela 1** - Mecanismos propostos para a resistência aos fármacos anti-tumorais [adaptado de Koda-Kimble *et al.*<sup>6]</sup>

<i>Mecanismo</i>	<i>Exemplos de fármacos afectados</i>
Maior reparação do DNA	Cisplatina, mecloretamina, melphalan
Não activação do fármaco	Citarabina, metotrexato, tioguanina, doxorubicina
Maior activação do fármaco	Mercaptopurina, citarabina
Diminuição do influxo celular	Melphalan, metotrexato
Aumento do efluxo (multi-resistência)	Etopósido, vinblastina, paclitaxel, daunorrubicina, vinorelbina, topotecano, estramustina
Vias bioquímicas alternativas	Metotrexato, citarabina
Alterações nas estruturas-alvo	Fluoruracilo, hidroxiureia, metotrexato, etopósido

Observou-se que a sobre-expressão deste transportador se correlacionava directamente com o grau de resistência demonstrado por algumas linhas celulares tumorais<sup>8</sup>, pelo que rapidamente se tornou uma das proteínas transmembranares mais estudadas. Em conjunto com a *MRP* e *BCRP*, são as três bombas de efluxo mais importantes na resistência das células eucariotas à acção farmacológica<sup>2,7</sup>.

**1.2 A Glicoproteína-P.** Os primeiros estudos de cristalografia e microscopia electrónica revelaram que a organização básica da P-gp consiste numa sequência de 1280 aminoácidos organizados em duas unidades funcionais. Cada uma das unidades contém seis domínios transmembranares (TMD) e um domínio onde ocorre a ligação a nucleótidos (NBD), ligados por uma secção com maior flexibilidade (**Figura 1**).



**Figura 1** - Esquema bidimensional da P-gp. As linhas a tracejado indicam os limites da membrana celular; o segmento a vermelho corresponde à sequência do segmento de ligação.

A P-gp foi inicialmente designada por Gp170 devido à banda característica a 170kDa observável em electroforese, para a qual contribui ainda uma pequena sequência glicosilada na zona extracelular<sup>7,8</sup>, adquirindo mais recentemente a designação de CD243. As unidades transmembranares encontram-se organizadas de forma radial, formando um poro central assimétrico de dimensões 30 x 5-10 Å<sup>7</sup>. A sua distribuição no organismo é generalizada, predominando em epitélios com função excretora ou secretora como as células epiteliais do tubo digestivo, hepatócitos ou células do tubo proximal do rim<sup>9</sup>, desempenhando também um papel fundamental na integridade da barreira hematoencefálica, diminuindo a sensibilidade do sistema nervoso central a um grande número de xenobióticos e agentes tóxicos<sup>10</sup>.

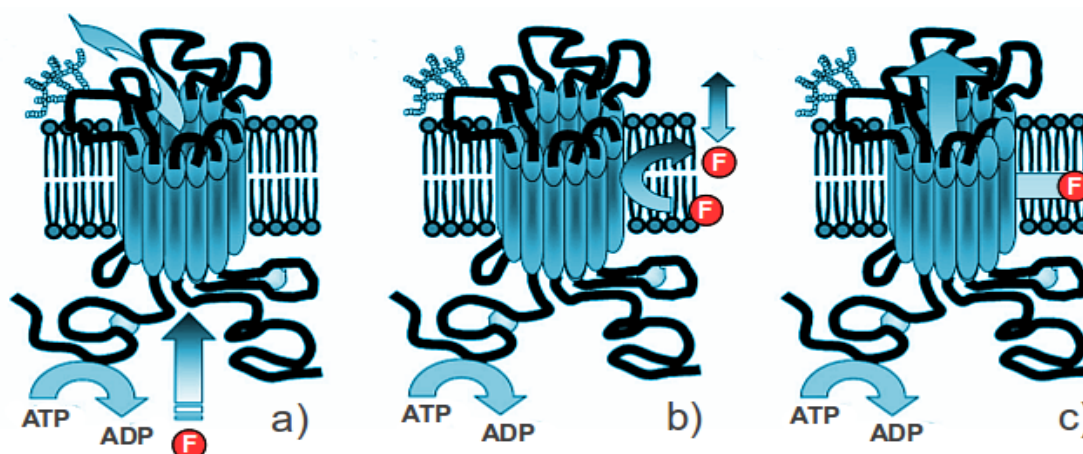
Como parte integrante da família dos transportadores ABC, a P-gp é uma bomba de efluxo que utiliza a energia do ATP para catalisar o efluxo de substratos para o exterior da célula<sup>11</sup> contra o seu gradiente de concentração. Estudos demonstraram que o transportador utiliza preferencialmente o complexo Mg-ATP, mesmo na presença de outras fontes de energia como o Ca-ATP, ADP ou AMP<sup>12</sup>, sendo identificadas duas sequências de aminoácidos conservadas em ambas as unidades que contêm um resíduo de cisteína (Cys431 e Cys1074) responsáveis pela ligação ao nucleótido. A inibição do ciclo catalítico foi conseguida através da alquilação destes resíduos com a utilização de N-etilmaleimida (NEM)<sup>10,12,13</sup>, demonstrando que a reacção de hidrólise ocorre com afinidades semelhantes em ambos os NBDs<sup>13</sup>, ou através da utilização de ortovanadato de sódio, devido à propriedade do vanádio em formar complexos estáveis não-covalentes com o Mg-ADP no centro catalítico<sup>10</sup>. No entanto, resíduos de lisina presentes no NBD também mostraram afectar directamente o ciclo catalítico, pois a reacção com 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) impede igualmente a hidrólise do ATP<sup>13</sup>.

Um conjunto de mutações com influência directa na actividade da ATPase foram também identificadas, sendo registados aumentos (F335A), diminuições (F978A) ou alterações no grau de activação (G141V, G185V e G830V) do transportador por substratos como a colchicina, verapamil ou vinblastina. As mutações situadas nas sequências conservadas intimamente relacionadas com a actividade hidrolítica (K433M, K1076M, G432S e G1075S) eliminam totalmente a actividade catalítica da P-gp.

Muitos dos compostos transportados pela P-gp não se encontram relacionados

estruturalmente, e incluem não só agentes farmacológicos como produtos de origem natural. Estudos de foto-afinidade demonstraram que os resíduos associados à interacção com os substratos se localizam nos TMD 5, 6, 11 e 12<sup>14</sup>. Novos estudos complementares evidenciaram ainda que a cavidade interna poderá encontrar-se preenchida por moléculas de água, contribuindo as hélices transmembranares 3, 5, 8 e 11 para 70% da área do local de ligação aos substratos (DBS), implicando activamente as hélices 6 e 12 na alteração conformacional que possibilita o processo de translocação<sup>15,16</sup>. O segmento que conecta as duas unidades provou ser essencial para a actividade e igualmente importante na regulação da especificidade dos substratos para a P-gp<sup>17,18</sup>, mediando a interacção entre os NBD durante o processo de hidrólise do ATP<sup>18</sup>. Este facto foi verificado em estudos onde a actividade da ATPase e o efluxo de moléculas foi completamente suprimido em P-gp mutantes cuja sequência intermédia havia sido eliminada. No entanto a adição de uma sequência intermédia móvel, mesmo que distinta da original, é suficiente para restaurar completamente ambas as actividades<sup>17</sup>.

Devido ao conhecimento limitado da estrutura tridimensional da P-gp, e com base em proteínas de estrutura semelhante, foram propostos diversos mecanismos que visam clarificar o mecanismo de acção do transportador. A **Figura 2** apresenta esquemas do modelo do poro membranar (a)<sup>19</sup>, da flipase (b)<sup>20</sup> ou do aspirador hidrofóbico (*Hydrophobic Vacuum Cleaner Model* – c)<sup>21</sup>.



**Figura 2** - Mecanismos propostos para o modo de funcionamento da P-gp na extrusão dos fármacos (F). Modelo do poro membranar (a)<sup>19</sup>; flipase (b)<sup>20</sup>; aspirador hidrofóbico (c)<sup>21</sup>. [adaptado de Varma *et al.*<sup>22</sup>].

Enquanto que no modelo do poro membranar a proteína funciona como um canal,

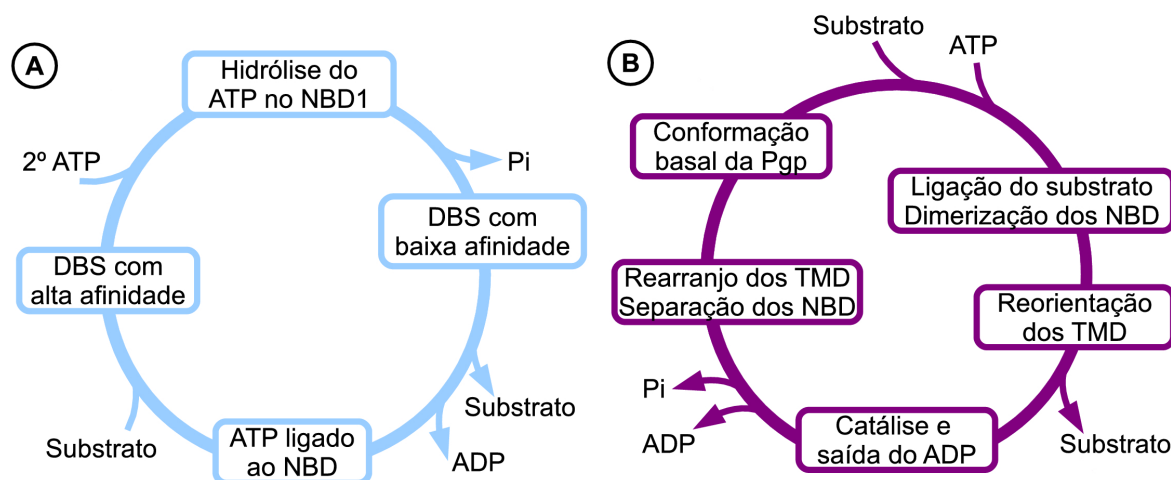
capturando moléculas do interior celular e enviando-as para o exterior, o modelo do aspirador hidrofóbico implica a remoção activa da molécula a partir da parte interna da membrana celular, translocando-a para a externa ou para o exterior. O modelo da flipase consiste numa alteração ao aspirador hidrofóbico, suportado por estudos efectuados num transportador semelhante codificado pelo gene *MDR2*, que funciona como um transportador de moléculas de fosfatidilcolina da camada interna da membrana para a camada exterior<sup>10</sup>.

Comum a todos os mecanismos é a hidrólise de uma molécula de ATP, essencial no fornecimento da energia necessária para a alteração de conformação que permite a expulsão dos xenobióticos<sup>22</sup>. Foi demonstrado que, embora ambos os locais de ligação ao ATP sejam cataliticamente activos<sup>23</sup>, a ligação das duas moléculas de ATP é efectuada de um modo alternado<sup>24</sup>. Estudos iniciais afirmam que a ligação do ATP num dos NBD induz um aumento da afinidade do DBS para o substrato, não existindo hidrólise devido ao bloqueio provocado pelo segundo NBD. A ligação de uma segunda molécula de ATP no segundo NBD permite a hidrólise da primeira molécula de ATP, a libertação do grupo fosfato e consequente activação do ciclo catalítico<sup>13</sup>. Existiria, portanto, um mecanismo de controlo da afinidade no local de ligação, dependendo das características intrínsecas da molécula e da capacidade desta em interagir de um modo adequado com o local de ligação<sup>25</sup>. Após o efluxo, a proteína adquire uma conformação de baixa afinidade para substratos e nucleótidos<sup>26</sup>, sendo necessária a libertação do ADP para que o transportador regresse à conformação nativa. (**Esquema 1-A**)<sup>13,24</sup>. No entanto, estudos mais recentes indicam que é a própria ligação do substrato e do ATP que induz a alteração conformacional, reorientando os resíduos do DBS para o estado de baixa afinidade (**Esquema 1-B**)<sup>27</sup>.

As hélices cujos resíduos compõem o DBS rodariam, expondo o interior do mesmo ao meio extracelular e possibilitando a libertação da molécula para o exterior<sup>28</sup>. No decurso da modificação estrutural do transportador, os dois NBD formam um dímero e a hidrólise do ATP seria utilizada para restaurar a posição inicial das hélices transmembranares e catalisar a separação dos NBD<sup>27</sup>. Este modelo é suportado por estudos onde a introdução de mutações em resíduos específicos afectaram a taxa de hidrólise do ATP, nomeadamente através da restrição da rotação de alguns TMD<sup>29</sup> ou da identificação da



importância de aminoácidos específicos para o favorecimento da reacção de hidrólise do ATP<sup>30</sup>.



**Esquema 1** - Ciclo catalítico proposto por Senior *et al.* (A)<sup>13</sup> e por Callaghan *et al.* (B)<sup>27</sup>

No caso específico da P-gp, a importância da membrana celular foi também avaliada em estudos que demonstraram que as moléculas com maior actividade moduladora possuem um coeficiente de partilha e uma constante de ionização que favorece a sua difusão na camada interna da membrana, aumentando deste modo a interacção com os domínios de ligação do transportador<sup>12,31-33</sup>, o que suporta o modelo do aspirador hidrofóbico em detrimento dos modelos da flipase ou do poro membranar. Estes estudos complementam resultados anteriores que referem a composição da membrana e os lípidos que a constituem como unidades importantes na actividade da P-gp<sup>10,21,31</sup>, representando o conjunto membrana/proteína uma única unidade funcional e não duas estruturas independentes<sup>34</sup>. A complexidade da membrana das células eucariotas<sup>35</sup> e a sua fluidez é igualmente influenciada pela quantidade de colesterol existente, pelo que a existência de micro-domínios particularmente ricos em colesterol<sup>36</sup> parece exercer uma influência positiva na actividade de translocação da P-gp.

A recente publicação da Glicoproteína-P murina, com 89% de similaridade com a P-gp humana, constitui um modelo base mais fiável para estudos de homologia, permitindo a execução de simulações computacionais mais fiáveis. Foi identificada uma cavidade interna com um volume de aproximadamente 6.000 Å<sup>3</sup> que abre para o compartimento intracelular, encontrando-se também exposta à camada interna da membrana através de duas aberturas delimitadas pelas hélices (TMD) 4/6 e 10/12, favorecendo uma vez mais a

teoria do aspirador hidrofóbico. Foram identificados 73 resíduos expostos no interior da cavidade, 15 dos quais com características polares e somente 2 possivelmente ionizados (His60 e Glu871)<sup>37</sup>. Infelizmente, a estrutura encontra-se incompleta, não tendo sido determinada a estrutura secundária dos segmentos inicial (32 aa), final (5 aa) e da sequência de ligação entre os aminoácidos Ala627 e Ala683, correspondendo a 56 aminoácidos, cuja presença é essencial para a actividade.

## REFERÊNCIAS

- (1) J. Ferlay, H.-R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, D.M. Parkin, Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008., *International journal of cancer*, **2010**, 127, 2893-917, doi:10.1002/ijc.25516.
- (2) J.B. Taylor, D.J. Triggle, *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, Vol. 7, Elsevier, **2006**.
- (3) G.L. Patrick, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 3rd ed., Oxford University Press, **2005**.
- (4) V.T. Devita, S. Hellman, S.A. Rosenberg, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers, **2001**.
- (5) S.A. Frank, Genetic predisposition to cancer - insights from population genetics., *Nature Reviews Genetics*, **2004**, 5, 764-772, doi:10.1038/nrg1450.
- (6) M.A. Koda-Kimble, L.Y. Young, B.J. Guglielmo, W.A. Kradjan, B.K. Alldredge, R.L. Corelli, B.R. Williams, *Applied Therapeutics - The Clinical Use of Drugs*, Lippincott Williams & Wilkins, **2009**.
- (7) M.I. Borges-Walmsley, K.S. McKeegan, A.R. Walmsley, Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs., *Biochemical Journal*, **2003**, 376, 313-38, doi:10.1042/BJ20020957.
- (8) R. Juliano, V. Ling, A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants., *Biochimica et Biophysica Acta*, **1976**, 455, 152-162, doi:10.1016/0005-2736(76)90160-7.
- (9) F. Thiebaut, T. Tsuruo, H. Hamada, M.M. Gottesman, I. Pastan, M.C. Willingham, Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **1987**, 84, 7735-7738.
- (10) S.V. Ambudkar, S. Dey, C.A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan, M.M. Gottesman, Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter., *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, **1999**, 39, 361-398, doi:10.1146/annurev.pharmtox.39.1.361.
- (11) M. Dean, *The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily*, Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, **2002**.
- (12) A.E. Senior, M.K. Al-Shawi, I.L. Urbatsch, ATP Hydrolysis by Multidrug-Resistance Protein from Chinese Hamster Ovary Cells., *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **1995**, 27, 31-36.
- (13) A.E. Senior, M.K. Al-Shawi, I.L. Urbatsch, The catalytic cycle of P-glycoprotein., *FEBS Letters*, **1995**, 377, 285-289, doi:10.1016/0014-5793(95)01345-8.
- (14) F.J. Sharom, The P-glycoprotein Efflux Pump: How Does it Transport Drugs?, *Journal of Membrane Biology*, **1997**, 160, 161-175.
- (15) E. Crowley, R. Callaghan, Multidrug efflux pumps: drug binding – gates or cavity?, *FEBS Journal*, **2010**, 277, 530-539, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07484.x.

- (16) E. Crowley, M.L. O'Mara, C. Reynolds, D.P. Tieleman, J. Storm, I.D. Kerr, R. Callaghan, Transmembrane Helix 12 Modulates Progression of the ATP Catalytic Cycle in ABCB1., *Biochemistry*, **2009**, 48, 6249–6258, doi:10.1021/bi900373x.
- (17) C.A. Hrycyna, L.E. Airan, U.A. Germann, S.V. Ambudkar, I. Pastan, M.M. Gottesman, Structural flexibility of the linker region of human P-glycoprotein permits ATP hydrolysis and drug transport., *Biochemistry*, **1998**, 37, 13660–13673, doi:10.1021/bi9808823.
- (18) T. Sato, A. Kodan, Y. Kimura, K. Ueda, T. Nakatsu, H. Kato, Functional role of the linker region in purified human P-glycoprotein., *FEBS Journal*, **2009**, 276, 3504–3516, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07072.x.
- (19) G.A. Altenberg, C.G. Vanoye, J.K. Horton, L. Reuss, Unidirectional fluxes of rhodamine 123 in multidrug-resistant cells: evidence against direct drug extrusion from the plasma membrane., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **1994**, 91, 4654–7.
- (20) C.F. Higgins, M.M. Gottesman, Is the multidrug transporter a flippase?, *Trends in Biochemical Sciences*, **1992**, 17, 18–21, doi:10.1016/0968-0004(92)90419-A.
- (21) Y. Raviv, H.B. Pollard, E.P. Bruggemann, I. Pastan, M.M. Gottesman, Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells., *Journal of Biological Chemistry*, **1990**, 265, 3975–3980.
- (22) M.V.S. Varma, Y. Ashokraj, C.S. Dey, R. Panchagnula, P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement., *Pharmacological Research*, **2003**, 48, 347–359, doi:10.1016/S1043-6618(03)00158-0.
- (23) I.L. Urbatsch, B. Sankaran, S. Bhagat, A.E. Senior, Both P-glycoprotein Nucleotide-binding Sites Are Catalytically Active., *Journal of Biological Chemistry*, **1995**, 270, 26956–26961, doi:10.1074/jbc.270.45.26956.
- (24) Z.E. Sauna, M.M. Smith, M. Muller, K.M. Kerr, S.V. Ambudkar, The Mechanism of Action of Multidrug-Resistance-Linked P-Glycoprotein., *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **2001**, 33, 481–491, doi:10.1023/A:1012875105006.
- (25) C. Martin, G. Berridge, P. Mistry, C. Higgins, P. Charlton, R. Callaghan, Drug Binding Sites on P-Glycoprotein Are Altered by ATP Binding Prior to Nucleotide Hydrolysis., *Biochemistry*, **2000**, 39, 11901–11906, doi:10.1021/bi000559b.
- (26) M. Ramachandra, S.V. Ambudkar, D. Chen, C.A. Hrycyna, S. Dey, M.M. Gottesman, I. Pastan, Human P-Glycoprotein Exhibits Reduced Affinity for Substrates during a Catalytic Transition State., *Biochemistry*, **1998**, 37, 4693–5038, doi:10.1021/bi973045u.
- (27) R. Callaghan, R.C. Ford, I.D. Kerr, The translocation mechanism of P-glycoprotein., *FEBS Letters*, **2006**, 580, 1056–1063, doi:10.1016/j.febslet.2005.11.083.
- (28) M.F. Rosenberg, G. Velarde, R.C. Ford, C. Martin, G. Berridge, I.D. Kerr, R. Callaghan, A. Schmidlin, C. Wooding, K.J. Linton, C.F. Higgins, Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle., *EMBO Journal*, **2001**, 20, 5615–5625.

- (29) J. Storm, M.L. O'Mara, E.H. Crowley, J. Peall, D.P. Tieleman, I.D. Kerr, R. Callaghan, Residue G346 in Transmembrane Segment Six is Involved in Inter-Domain Communication in P-Glycoprotein., *Biochemistry*, **2007**, 46, 9899-9910, doi:10.1021/bi700447p.
- (30) A. Rothnie, J. Storm, R. McMahon, A. Taylor, I.D. Kerr, R. Callaghan, The coupling mechanism of P-glycoprotein involves residue L339 in the sixth membrane spanning segment., *FEBS Letters*, **2005**, 579, 3984-3990, doi:10.1016/j.febslet.2005.06.030.
- (31) I.L. Urbatsch, A.E. Senior, Effects of Lipids on ATPase Activity of Purified Chinese Hamster P-Glycoprotein., *Archiv der Pharmazie*, **1995**, 316, 135-140, doi:10.1006/abbi.1995.1020.
- (32) G.D. Eytan, R. Regev, G. Oren, Y.G. Assaraf, The Role of Passive Transbilayer Drug Movement in Multidrug Resistance and Its Modulation., *Journal of Biological Chemistry*, **1995**, 271, 12897-12902.
- (33) Y. Romsicki, F.J. Sharom, The membrane lipid environment modulates drug interactions with the P-glycoprotein multidrug transporter., *Biochemistry*, **1999**, 38, 6887-6896, doi:10.1021/bi990064q.
- (34) K. Klappe, I. Hummel, D. Hoekstra, J.W. Kok, Lipid dependence of ABC transporter localization and function., *Chemistry and Physics of Lipids*, **2009**, 161, 57-64, doi:10.1016/j.chemphyslip.2009.07.004.
- (35) P. Risé, S. Eligini, S. Ghezzi, S. Colli, C. Galli, Fatty acid composition of plasma, blood cells and whole blood: Relevance for the assessment of the fatty acid status in humans., *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **2007**, 76, 363-369, doi:10.1016/j.plefa.2007.05.003.
- (36) S. Orłowski, S. Martin, A. Escargueil, P-glycoprotein and "lipid rafts": some ambiguous mutual relationships (floating on them, building them or meeting them by chance?)., *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2006**, 63, 1038-1059, doi:10.1007/s00018-005-5554-9.
- (37) S.G. Aller, J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, P.M. Harrell, Y.T. Trinh, Q. Zhang, I.L. Urbatsch, G. Chang, Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding., *Science*, **2009**, 323, 1718-1722, doi:10.1126/science.1168750.

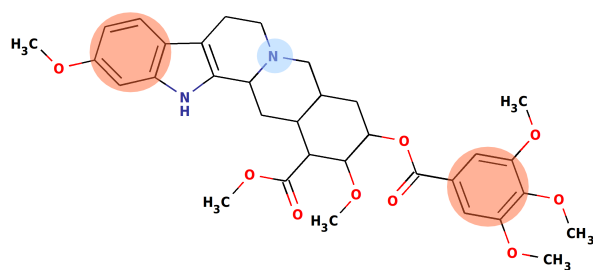
## *Capítulo II*

### *Desenvolvimento do Farmacóforo*



**2.1. Introdução.** Com a descoberta da possibilidade de inibição da P-gp presente em células tumorais pelo verapamil no início da década de 1980<sup>1</sup>, numerosos estudos foram efectuados na tentativa de desenvolver inibidores eficazes desta proteína, de modo a superar a multi-resistência de algumas linhas celulares à acção dos anti-tumorais. No entanto, a grande variedade de estruturas que estas proteínas são capazes de transportar e a toxicidade intrínseca provocada pelas elevadas concentrações necessárias para uma inibição eficaz limitou avanços mais significativos. A determinação de um farmacóforo, definido como *“um conjunto de características estéricas e electrónicas necessárias para assegurar as interações supramoleculares óptimas com uma estrutura-alvo biológica específica, desencadeando (ou bloqueando) a sua função biológica. Não representa a molécula real (...) mas sim um conceito abstracto que tem em conta as interacções moleculares comuns de um grupo de compostos para com uma estrutura-alvo”*<sup>2</sup>, permitiu uma abordagem inovadora do problema.

Um dos primeiros estudos de farmacóforos da P-gp foi efectuado com análogos da reserpina, uma molécula de origem natural com capacidade para reverter a resistência à vinblastina em concentrações até 10  $\mu$ M. Foram determinados três domínios essenciais à actividade moduladora (**Figura 3**), dois aromáticos e um composto por uma amina



**Figura 3** - Farmacóforo proposto por Pearce, com dois pontos aromáticos (laranja) e um dador de electrões (azul). [adaptado de Pierce *et al.*<sup>3</sup>]

terciária, aceitadora de pontes de hidrogénio<sup>3</sup>. Ambos os núcleos aromáticos mostraram ser essenciais para a modulação, uma vez que análogos em que um dos domínios esteja omissos não revelam actividade inibitória. Mesmo nos análogos com

uma orientação espacial distinta, a posição dos grupos encontra-se

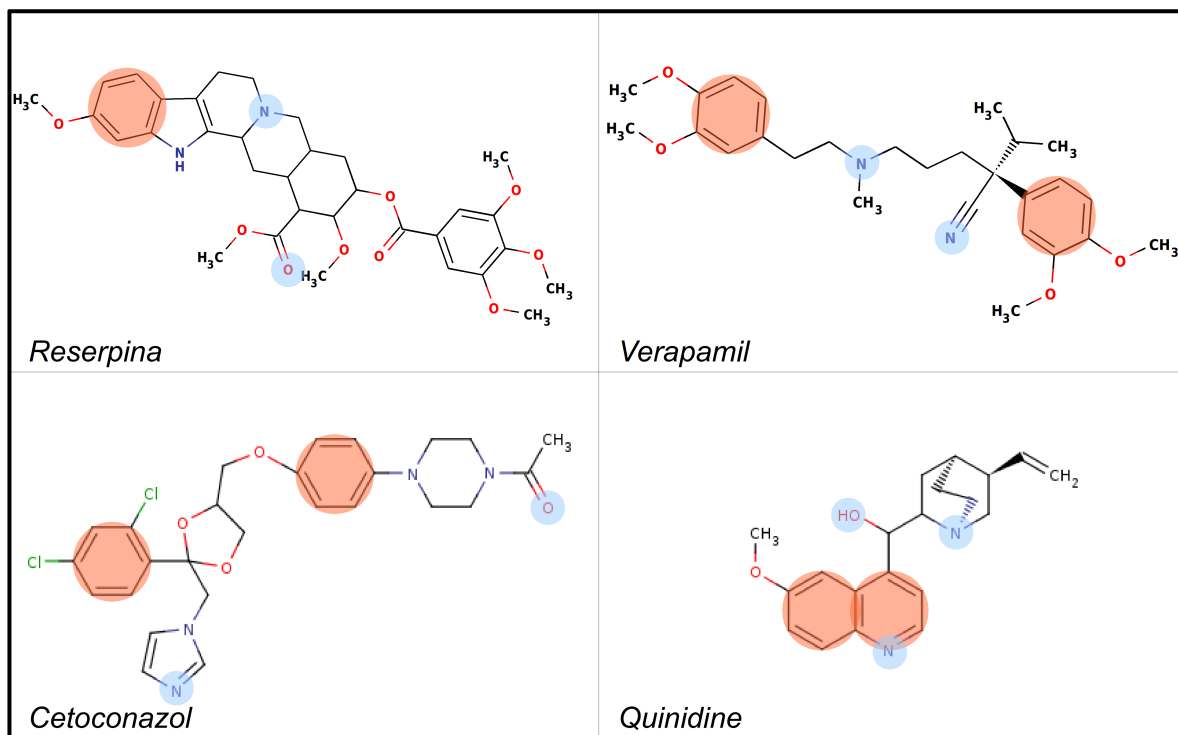
relativamente fixa no espaço, tendo sido observada uma actividade comparável à da reserpina. A protonação da amina pode também permitir interacções iónicas adicionais<sup>3</sup>. Este farmacóforo definido por Pearce *et al.* foi o ponto de partida para a realização de novos estudos que permitiram compreender com maior profundidade a interacção entre os substratos e a P-gp. No entanto, não pode ser aplicado a muitas das moléculas



transportadas nem considera o estado de protonação da molécula. Foi determinado que a presença de anéis aromáticos contribui para o aumento da afinidade através de interações entre os electrões das orbitais  $\pi$  com aminoácidos aromáticos existentes no DBS<sup>4</sup>. Já a hidrofobicidade da estrutura, um parâmetro igualmente importante, foi definida bastante mais tarde como uma variável a considerar<sup>5</sup>. No entanto, muitas moléculas portadoras de grupos polares possuem afinidade para o local de ligação, pelo que estudos revelaram que os grupos com capacidade aceitadora de pontes de hidrogénio (Acc), especialmente hidroxilos, éteres ou carbonilos, revestem-se de especial importância na afinidade da molécula, no reconhecimento e na interacção para com a proteína. Um estudo em particular<sup>6</sup> definiu dois tipos de padrões de reconhecimento, consoante as moléculas possuísem dois (*Tipo I*) ou três (*Tipo II*) grupos aceptores de pontes de hidrogénio separados por distâncias particularmente definidas. Verificou também que os grupos mais frequentemente envolvidos na formação de pontes de hidrogénio integravam os átomos de oxigénio dos grupos anteriormente referidos em detrimento de grupos contendo átomos de azoto. Outros estudos, com resultados mais contraditórios, revelam a presença de um átomo de azoto como um parâmetro essencial, identificado em moléculas contendo derivados quinolínicos ou piperazínicos<sup>7</sup>. Estes estudos referem como sendo essencial a presença de um átomo ou grupo que possibilite a formação de pontes de hidrogénio, e que a presença de um azoto quaternário (positivo) seria prejudicial para a actividade<sup>8</sup>. Um outro estudo refere que o azoto, encontrando-se maioritariamente protonado a pH fisiológico não é essencial, porque a sua interacção com a P-gp seria de carácter não-iónico e apenas determinado pela sua capacidade como dador de electrões<sup>9</sup>. A distância mínima óptima entre os grupos dadores e os grupos hidrofóbicos foi também definida como nunca inferior a 5 Å<sup>7</sup>.

Todos os estudos anteriores forneceram dados concretos que permitiram uma melhor definição de um farmacóforo específico para os inibidores da multi-resistência, através do estudo das características físico-químicas e estruturais de moléculas com actividade moduladora da P-gp. Já na presente década, vários estudos determinaram as combinações mais frequentes das características presentes em fármacos inibidores (**Figura 4**), tendo sido evidenciadas combinações em número aleatório de domínios hidrofóbicos (aromáticos ou alifáticos), aceptores e dadores de pontes de hidrogénio, estes últimos

contribuindo para a formação de ligações adicionais com o DBS<sup>10</sup>.



**Figura 4** - Exemplos de farmacóforos derivados de diferentes estruturas [adaptado de Pajeva *et al.*<sup>10</sup>].

De acordo com este estudo, o aumento do número de grupos presentes na molécula aumenta o número de combinações permitidas e, conseqüentemente, a afinidade da mesma para o local de ligação. Moléculas de estrutura química distinta e diferente orientação espacial podem assim interagir com diferentes resíduos no mesmo local do receptor, activando ou bloqueando o ciclo catalítico. A combinação mais frequente de pontos farmacofóricos foi determinada como sendo aquela que possui cinco pontos, três hidrofóbicos e dois aceitadores de pontes de hidrogénio. No entanto, a existência de pontos com capacidade dadora de pontes de hidrogénio não é de excluir, porque a existência de átomos de azoto nas moléculas estudadas podem ou não encontrar-se protonados a pH fisiológico<sup>10</sup>. Até ao presente momento, poucos estudos consideraram a existência de dadores de pontes de hidrogénio ou domínios catiónicos<sup>8,11</sup>, incidindo na importância da combinação de múltiplos átomos ou grupos com capacidade aceitadora<sup>6</sup>. Os resultados obtidos confirmam os grupos aromáticos/alifáticos das moléculas como importantes na ligação e reconhecimento para com a proteína, enquanto que os grupos dadores de electrões influenciam directamente a orientação espacial e a afinidade, ao

estabelecer um número variável de interações com os resíduos do DBS. Embora o estudo anterior apenas tenha descrito um conjunto de pontos farmacofóricos comuns, sugerindo a existência de múltiplos locais de ligação das moléculas no DBS, outros estudos determinaram farmacóforos específicos para moléculas como o verapamil ou a ciclosporina A. Ambos os farmacóforos possuem um domínio aromático, um aceitador de pontes de hidrogénio e dois ou três pontos hidrofóbicos<sup>12</sup>.

Os resultados do estudo anterior suportam a existência de vários locais de ligação no DBS, sendo a afinidade determinada pela distribuição da hidrofobicidade e grupos polares na molécula. No entanto, este farmacóforo não identifica os grupos associados à formação de pontes de hidrogénio (azotos ou oxigénios), nem se encontra de acordo com as unidades de reconhecimento definidas por Seelig<sup>6</sup> para a interacção com a P-gp. No entanto, a distância entre o grupo aceitador de pontes de hidrogénio e os domínios aromáticos/hidrofóbicos encontra-se de acordo com o estabelecido por Suzuki<sup>7</sup>.

Estudos alternativos visaram a determinação de farmacóforos para diversas famílias de inibidores da P-gp, através de modelos tridimensionais de relação estrutura-actividade (3D-QSAR) e produziram quatro padrões distintos de farmacóforos, baseados em quatro famílias de inibidores, que se encontram descritos na **Tabela 2**.

**Tabela 2**

Farmacóforos de vários ensaios 3D-QSAR [adaptado de Ekins *et al.*<sup>13</sup>]

Ensaio efectuado	Características determinadas
Inibição do transporte da digoxina em células Caco-2 (n=27)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 pontos hidrofóbicos</li> <li>• 1 ponto aceitador de pontes de hidrogénio</li> </ul>
Inibição da ligação da vinblastina a vesículas da membrana plasmática (n=21)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 pontos aromáticos</li> <li>• 1 ponto hidrofóbico</li> </ul>
Inibição da acumulação da vinblastina em células LLC-PK1 (n=17)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 pontos hidrofóbicos</li> <li>• 1 ponto aceitador de pontes de hidrogénio</li> </ul>
Inibição da acumulação da calceína em células LLC-PK1 (n=18)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 pontos hidrofóbicos</li> <li>• 1 ponto aromático</li> <li>• 1 ponto dador de pontes de hidrogénio</li> </ul>

Este estudo evidenciou o carácter hidrofóbico das moléculas como um dos factores

preponderantes para o reconhecimento por parte da P-gp<sup>13</sup>. A sobreposição parcial evidenciada entre os vários farmacóforos sugere que o DBS possui uma zona comum a todos os farmacóforos determinados. A determinação de pontos aceitadores e dadores encontra-se de acordo com resultados anteriores, embora mais uma vez não se verifique a existência das unidades identificadas por Seelig, sendo possível concluir que a presença destas unidades é importante mas não essencial para o reconhecimento dos moduladores.

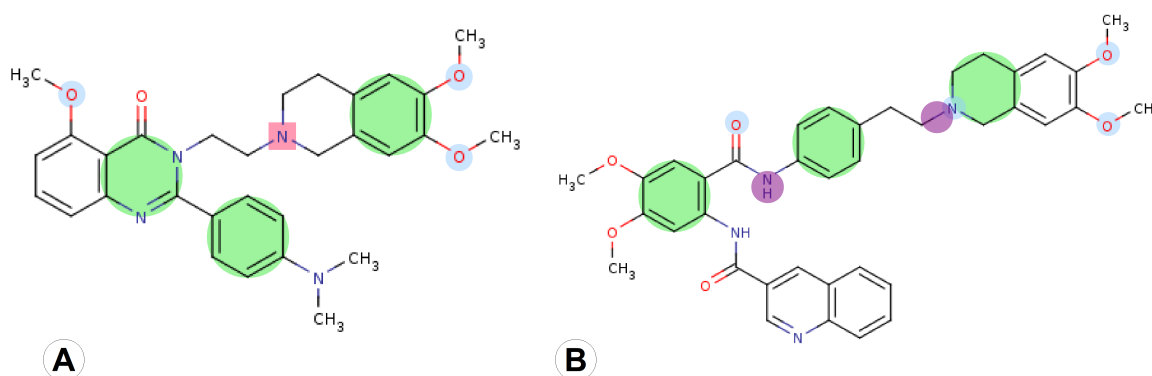
Em 2003, um estudo clarificou o modo como diferentes estruturas podem inibir o funcionamento da P-gp, além de identificar as características fundamentais para que moléculas possam modular o efluxo. Esta modulação é passível de ser efectuada em quatro locais distintos, classificados como locais transportadores ou moduladores<sup>14</sup>. Segundo este estudo, as moléculas podem actuar por inibição competitiva da ligação dos substratos envolvidos directamente no processo de efluxo, como o verapamil ou o tariquidar. O outro mecanismo relaciona-se com a inibição da ligação ou hidrólise do ATP, impedindo a alteração conformacional que regula a afinidade dos substratos para o DBS e a translocação de moléculas para o meio extra-celular. Este último pode ser explicado pela existência de uma zona moduladora próxima ao local de ligação do ATP, onde substratos como moléculas esteróides (progesterona) ou flavonóides (quercetina, galangina) interagem<sup>14</sup>. Esta conclusão foi confirmada por estudos independentes que incidiram sobre as propriedades inibidoras de diversos flavonóides, porque embora os flavonóides prenilados tenham propriedades que permitam a sua interacção directa com o DBS transportador, flavonóides mais simples como a quercetina, kaempferido ou galangina tendem a actuar próximo do local de ligação do ATP, numa zona designada por *Steroid-binding Hydrophobic Region* (SBHR), comum aos derivados esteróides<sup>15,16</sup>. O impedimento estérico causado pela interacção das moléculas com este local impede a correcta ligação ou a hidrólise da molécula de ATP, condicionando a alteração conformacional que catalisa o efluxo ou o retorno da proteína à conformação inicial<sup>16</sup>.

Complementar a estes estudos, foram propostas três regras base envolvendo o tamanho e volume molecular, a capacidade de aceitar pontes de hidrogénio (através do número de azotos e oxigénios) e o pK<sub>a</sub> dos grupos existentes na molécula. Verificou-se que compostos com peso molecular superior a 400 g.mol<sup>-1</sup>, um número de azotos e oxigénios igual ou

superior a 8 e um  $pK_a$  superior a 4 são passíveis de serem substratos para a P-gp<sup>17</sup>, equiparando a P-gp a um mini sistema farmacocinético de baixa especificidade com capacidade para acomodar substratos com estruturas moleculares bastante diversas. No entanto, estes resultados divergem de um estudo prévio que demonstrou que o pH do meio não afecta o transporte mediado pela P-gp<sup>18</sup>.

Estudos realizados especificamente em quinazolinonas, indolo- e pirrolo-pirimidinas, inibidores da P-gp e *MRP1*, identificaram pontos farmacofóricos que estão de acordo com resultados obtidos anteriormente, nomeadamente pontos hidrofóbicos, aceptadores e dadores de pontes de hidrogénio e um domínio catiónico (**Figura 5–A**)<sup>19</sup>.

Adicionalmente, um outro estudo também identificou um domínio catiónico num farmacóforo para a *MRP1* contendo cinco pontos<sup>11</sup>. A análise de análogos do tariquidar, um dos mais potentes inibidores da P-gp disponível, revela um padrão farmacofórico muito semelhante ao obtido com os derivados quinazolinónicos, composto por três pontos hidrofóbicos e três a quatro aceptadores de pontes de hidrogénio, podendo incluir dois dadores de pontes de hidrogénio quando considerada a protonação das aminas secundárias ou terciárias a pH fisiológico (**Figura 5–B**)<sup>20</sup>.

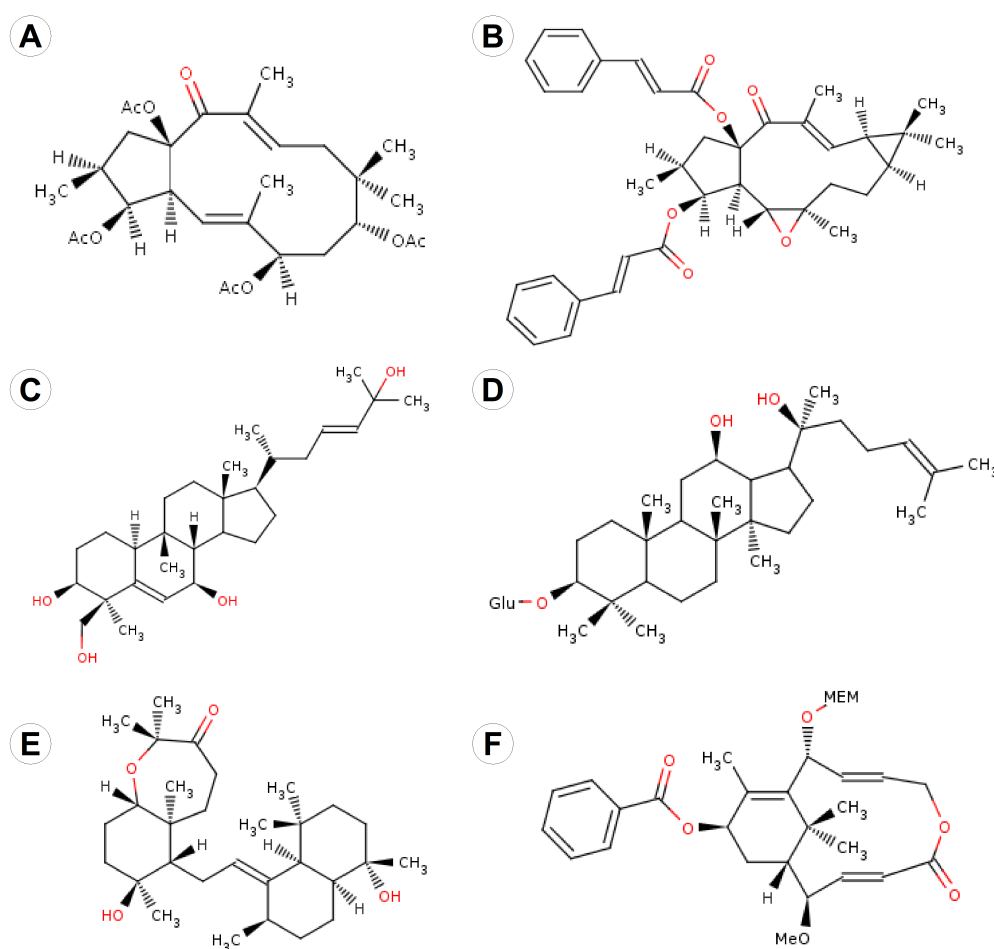


**Figura 5** - Farmacóforos obtidos para quinazolinonas (A) e para o tariquidar (B). Verde – hidrofóbico; azul – aceitador de pontes de hidrogénio; violeta – dador de pontes de hidrogénio; vermelho – catiónico. [adaptado de Pajeva *et al.*<sup>19,20</sup>].

Todos estes estudos apontam como características farmacofóricas comuns um grupo aceitador de pontes de hidrogénio directamente ligado a um anel aromático, um centro hidrofóbico adicional numa cadeia lateral flexível e um azoto terciário protonável, com capacidades para aceitar ou doar pontes de hidrogénio<sup>19</sup>. Uma maior rigidez na cadeia lateral em análogos do tariquidar aumentou a sua actividade inibitória, e a substituição

dos grupos metoxi no anel central por grupos mais volumosos produziu o efeito inverso. Foi ainda identificada uma elevada correlação entre os índices de hidrofobicidade e o efeito inibitório, corroborando a importância desta propriedade no efeito modulador das moléculas na P-gp<sup>20</sup>. No entanto, os estudos considerados utilizaram moléculas com uma variação estrutural limitada, o que impede a utilização dos farmacóforos obtidos em diferentes estruturas moleculares.

Apesar de muitos dos estudos anteriores apresentarem a definição para alguns farmacóforos, outros identificaram moléculas com propriedades moduladoras da P-gp cujas estruturas não se adequam aos farmacóforos propostos. Desde o início do século que moléculas isoladas de fontes naturais como os jatrofanos<sup>21</sup>, latiranos<sup>22-26</sup>, cucurbitanos<sup>27,28</sup>, ginsenósidos<sup>29</sup>, taxanos<sup>30</sup> ou sifolanos<sup>31</sup> demonstram, através de vários estudos, a sua capacidade moduladora no efluxo mediado pela P-gp (**Figura 6**).



**Figura 6** - Exemplos de moléculas de origem natural com actividade moduladora.

A - Jatrofanos; B - Latiranos; C - Cucurbitanos; D - Ginsenósidos; E - Sifolanos; F – Taxanos.

Estas moléculas são caracterizadas pela ausência total de átomos de azoto, sendo também frequente a ausência de anéis aromáticos, pelo que os pontos farmacofóricos determinados por esses domínios não podem ser aplicados com sucesso nesta classe de moduladores. No entanto, verifica-se a existência de unidades *Tipo I* e *Tipo II* definidas por Seelig e um elevado carácter hidrofóbico, estando por isso de acordo com os estudos que determinam a lipofilia e a existência de grupos aceitadores de pontes de hidrogénio como parâmetros fundamentais para a inibição da P-gp. Alguns dos estudos que identificaram outras moléculas como moduladores apresentam farmacóforos para as estruturas, mas a limitação do número e tipo de estruturas nos quais foram baseados, aliado ao facto de não terem sido consideradas estruturas similares descritas em estudos semelhantes, impede a sua utilização no desenvolvimento de moduladores mais selectivos.

Torna-se premente, por isso, a definição de um farmacóforo que considere não apenas estas estruturas mas todas as descritas na literatura, por forma a permitir um desenvolvimento de moduladores mais activos, selectivos e eficazes. Os moduladores assim obtidos poderiam ser utilizados clinicamente, em conjunto com os fármacos anti-tumorais, contribuindo para a diminuição ou total reversão do fenómeno da multi-resistência.

## **2.2. Metodologia**

**2.2.1 Criação das bases de dados.** Para a execução deste estudo, foram compiladas três bases de dados, num total de 272 compostos. A primeira, designada por *Controlo*, é composta por 152 moduladores e substratos com elevada afinidade para a P-gp, encontrando-se organizada em doze subgrupos, divididas com base nas afinidades e actividades propostas por Wang *et al.*<sup>14</sup> aos quais foram adicionados dois subgrupos correspondendo aos terpenóides sifolanos<sup>31</sup> e eufodendroidinas<sup>32</sup>, descritos na literatura como moduladores da multi-resistência. A segunda foi designada de *Moduladores* e inclui 74 moléculas exclusivamente isoladas a partir de plantas da espécie *Euphorbia*. A terceira base de dados inclui 46 moléculas categorizadas como não-substratos e foi criada para validar a exactidão das detecções dos farmacóforos, sendo designada de *Inactivos*. Todos os farmacóforos foram criados com recurso ao programa *Molecular Operating Environment* (MOE 2009.10)<sup>33</sup>. Para cada grupo e subgrupo, foram criados

individualmente farmacóforos que permitem a máxima detecção, através da utilização de duas funções disponíveis no programa designadas por *elucidação farmacofórica* e *alinhamento flexível com consenso farmacofórico*. As moléculas integrantes da base de dados *Inactivos* não foram utilizadas no desenvolvimento dos farmacóforos mas somente no seu refinamento e validação.

**2.2.2 Optimização molecular.** A estrutura de todos os compostos foi optimizada através de um processo de minimização energética com recurso ao campo de forças MMFF94x<sup>34,35</sup>, sendo definido um limite de  $10^{-5}$  para o valor quadrático médio (RMS) da optimização. As cargas atómicas parciais foram atribuídas antes da minimização e as respectivas estruturas minimizadas foram inseridas na base de dados correspondente, em conjunto com o nome e actividade. O estado de protonação dos grupos amina foi também tido em consideração, tendo sido criadas bases de dados idênticas às anteriores cuja única variação foi a protonação dos átomos de azoto.

### **2.2.3. Obtenção de farmacóforos**

**2.2.3.1. Elucidação farmacofórica.** A identificação dos possíveis pontos farmacofóricos existentes foi o ponto de partida para a realização de uma sobreposição inicial, em detrimento de um alinhamento com base na estrutura. Este alinhamento foi realizado em cada uma das bases de dados através da formação de padrões farmacofóricos aleatórios de 3, 4 ou 5 pontos, classificando o número de moléculas detectada, a sobreposição dos pontos e a exactidão dos padrões formados. Relativamente às opções que definem o alinhamento, foram seleccionadas três características adicionais (átomos aceitadores e/ou dadores de pontes de hidrogénio e hidrofóbicos) com uma tolerância de 1,4 Å, não modificando as restantes. Apenas o conjunto de pontos cuja percentagem de detecção tenha sido o mais elevado dentro de cada base de dados foi utilizado na determinação do farmacóforo final.

**2.2.3.2. Alinhamento flexível com consenso farmacofórico.** Em cada base de dados, foi previamente efectuada uma sobreposição espacial por forma a determinar a posição relativa de grupos similares no espaço conformacional. Este alinhamento privilegiou a natureza hidrofóbica da estrutura e a existência de grupos implicados no aumento da afinidade da molécula para com o transportador, nomeadamente aromáticos (ARO),



aceitadores (ACC) e dadores (DON) de pontes de hidrogénio. O alinhamento foi definido pela similaridade de sobreposição mais elevada, sendo em seguida definidos valores de tolerância (a máxima distância permitida para que dois pontos adjacentes sejam considerados vizinhos) e de limites mínimos para que um grupo de átomos seja considerado um único ponto farmacofórico. Os pontos farmacofóricos identificados nos grupos que apresentaram um valor máximo de sobreposição foram também considerados no desenvolvimento do farmacóforo final.

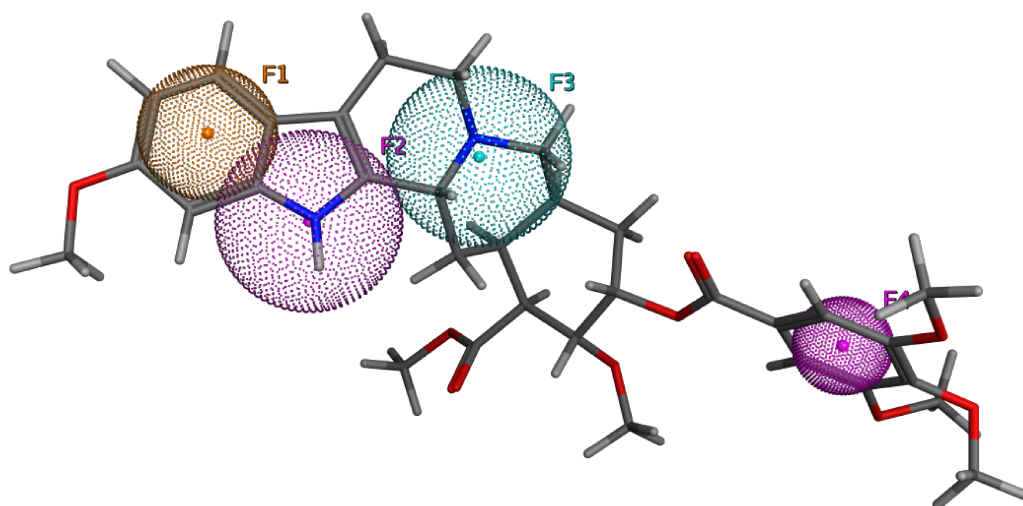
**2.3. Validação do método de construção do farmacóforo.** No decurso do desenvolvimento do farmacóforo proposto, foi efectuada uma avaliação prévia do farmacóforo publicado por Pearce *et al.*<sup>3</sup> em 1989, e testados quatro novos farmacóforos derivados exclusivamente de moléculas integrantes da base de dados obtida a partir de informações existentes na literatura (**Tabela 3**).

**Tabela 3** – Percentagens de detecção para cada farmacóforo desenvolvido. N é o número de compostos em cada base de dados.

Base de Dados (N)	Análogos da Reserpina	Inibidores da PCC	Farmacóforo A	Farmacóforo B	Presente trabalho
<b>Controlo (152)</b>	42,1%	60,5%	90,8%	66,4%	84,2%
<b>Moduladores (74)</b>	29,7%	97,2%	95,9%	50,0%	100,0%
<b>Inactivos (46)</b>	8,6%	13,0%	39,1%	13,0%	19,5%

**2.3.1. Construção do farmacóforo derivado dos análogos da reserpina.** Este farmacóforo tem a sua base no originalmente proposto por Pearce *et al.*, tendo sido desenvolvido a partir de 7 análogos da reserpina e composto por dois domínios aromáticos e um átomo de azoto básico com propriedades ACC<sup>3</sup>. A percentagem de detecção do farmacóforo original (2 domínios ARO – F1/F4 – e 1 domínio ACC – F3) é de apenas 26,3% no grupo *Controlo* (13,6% quando consideramos o estado de protonação do azoto a pH fisiológico) e 4,0% no grupo *Moduladores*. A identificação de uma característica DON adicional no átomo de azoto do anel aromático, em conjunto com a adição de características hidrofóbicas em todos os pontos à excepção de F1 (**Figura 7**) permitiu a correcta orientação espacial dos análogos e deu origem a um novo farmacóforo. O raio dos pontos varia de 1,0 a 1,9 Å e a máxima distância entre os dois pontos mais distantes é de 13,6 Å. Apesar de não detectar a maior parte das moléculas com actividade moduladora do grupo

*Controlo*, foi conseguido um aumento na percentagem de detecção para 42.1%. Um aumento menor foi também registado no grupo *Moduladores* (29,7%) e a detecção de falsos-positivos não excedeu os 8,6% (**Tabela 3**). A baixa percentagem de detecções revelada por este farmacóforo apresenta-se como uma consequência directa da existência de dois domínios aromáticos, uma vez que muitos dos moduladores não contém qualquer anel, outros possuem apenas um ou, na existência de dois, estes não se situam à distância requerida para a detecção por este farmacóforo em particular. Um outro problema reside no facto de pontos definidos no farmacóforo exibirem características múltiplas, o que pode introduzir artefactos no processo de detecção, pelo que o próximo passo foi a definição de um farmacóforo com uma característica única em cada ponto.

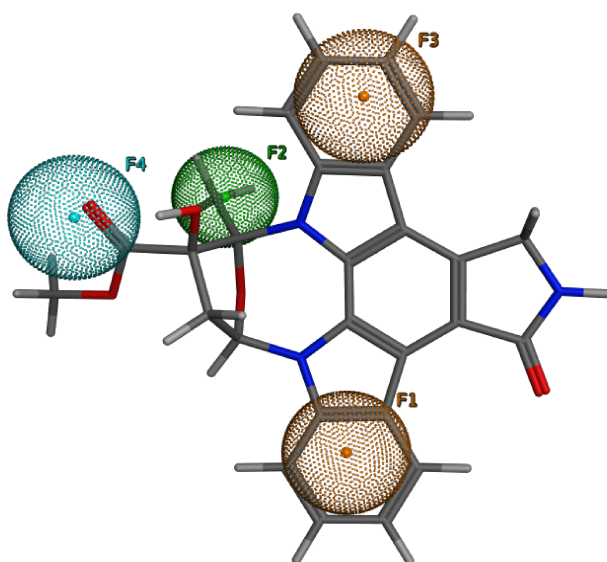


**Figura 7** - Farmacóforo derivado dos análogos da reserpina. F1, aromático; F2, dador/hidrofóbico; F3, aceitador/hidrofóbico; F4, aromático/hidrofóbico.

Com base no estudo de Ekins *et al.* que verificou que domínios hidrofóbicos (HYD) são frequentemente encontrados em diversos farmacóforos mas que apenas um dos detectados é identificado como aromático<sup>13</sup> e no estudo de Garrigues *et al.* e Tawari *et al.*, que desenvolveram farmacóforos com apenas uma característica aromática, definindo as restantes como simples HYD<sup>11,12</sup> e, por forma a aumentar a taxa de detecção anterior, foram desenvolvidos e testados farmacóforos alternativos, derivados de moléculas de diferentes famílias farmacológicas, tendo como objectivo a comparação das suas taxas de detecção com o farmacóforo obtido anteriormente.

**2.3.2. Construção do farmacóforo derivado dos inibidores da proteína Cinase C.** Este foi

o primeiro dos farmacóforos, desenvolvidos através da elucidação farmacofórica, que apresentou uma taxa de detecção acima de 95% (97,2%) no grupo *Moduladores* foi desenvolvido com base nos inibidores da proteína Cinase C (subgrupo 7 da Tabela I-A do Anexo I): o raio dos pontos não excede os 1,3 Å, a distância máxima entre os pontos mais afastados é inferior a 10 Å e apenas dois dos quatro pontos apresentam características múltiplas. Neste farmacóforo é possível identificar a prevalência de detecção de grupos carbonilo, hidroxilo ou átomos de oxigénio em detrimento de grupos amina, mesmo quando estes se encontram presentes na molécula. Um facto interessante verifica-se na detecção do grupo nitro na molécula da dexniguldipina como centro hidrofóbico e não como grupo negativo, provavelmente devido à carga parcial positiva existente no átomo de azoto.



**Figura 8** - Farmacóforo derivado dos inibidores da PKC sobreposto na molécula de K252-a. F1,aromático/hidrofóbico; F2, hidrofóbico; F3, aromático/hidrofóbico; F4, aceitador.

Comparativamente, a percentagem de detecção no grupo *Controlo* foi superior à obtida anteriormente (60,5%), não existindo variação significativa nos falsos-positivos (13,0%). Este aumento pode ser explicado com a redução do comprimento do eixo farmacofórico principal de 13,5 para 8,1 Å. Este farmacóforo permitiu ainda a identificação de propriedades hidrofóbicas e aromáticas como importantes no reconhecimento por parte do transportador, encontrando-se de acordo com o *aspirador hidrofóbico*, modelo proposto para o funcionamento da P-gp<sup>36</sup>.

Após o estudo inicial de Pearce *et al.*, a definição dos requisitos essenciais para o reconhecimento por parte da Glicoproteína-P foi complementada com o estudo de Suzuki *et al.*, que propôs pela primeira vez uma distância mínima de 5,0 Å entre o ACC e o HYD mais próximo, complementado mais tarde por Seelig através da sua definição de unidades compostas por dois ou três grupos dadores de electrões a distâncias de 2,5 Å (*Tipo I*) ou 4,6 Å (*Tipo II*) para os grupos mais afastados<sup>6,7</sup>. Tendo os respectivos estudos em consideração e o farmacóforo acima descrito, os resultados sugerem um aumento na taxa de detecção quando a distância máxima entre pontos se situa entre 8,0 e 10,0 Å. O facto acima descrito permite estabelecer um parâmetro adicional, onde a distância máxima entre o ACC e qualquer ponto não exceda 10 Å. No entanto, como apenas foi considerado um ACC e devido ao facto do grupo nitro ser detectado apesar da sua carga negativa, as unidades propostas por Seelig e o pressuposto de que a presença de grupos negativos podem inibir o reconhecimento por parte do transportador não foram passíveis de validação.

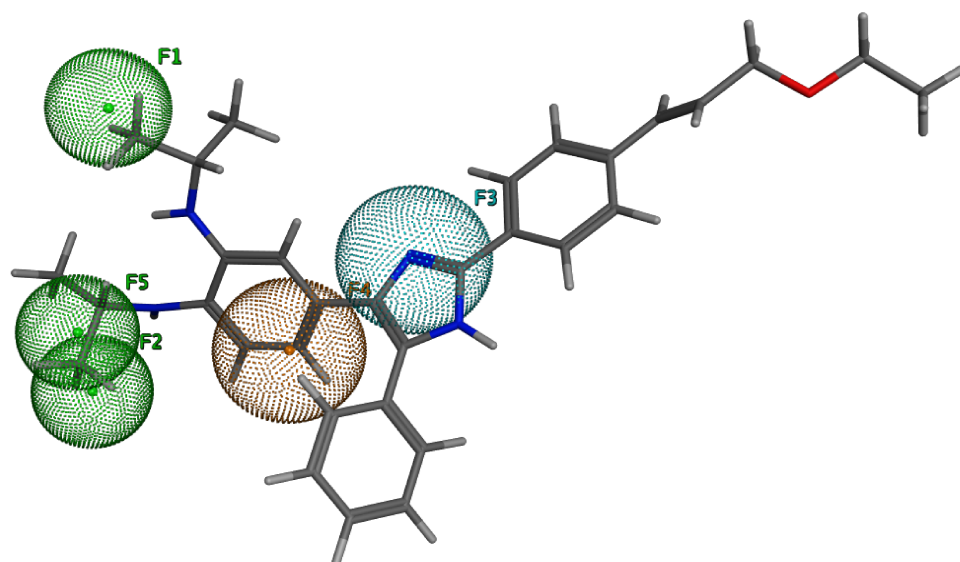
Numa tentativa de explicar a variedade estrutural dos substratos, Pajeva *et al.* efectuou um estudo onde foram identificados até seis possíveis grupos, na molécula de vinblastina, com características favoráveis para a interacção com a P-gp. Este estudo incidiu com especial relevo nos grupos aceitadores e dadores de pontes de hidrogénio<sup>10</sup> e estudos mais recentes do mesmo autor determinaram até nove pontos farmacofóricos possíveis, contendo no mínimo três centros hidrofóbicos e um número variável de ACC e DON<sup>20</sup>. Considerando os dois farmacóforos desenvolvidos no decorrer deste estudo, e assumindo que as interacções hidrofóbicas são mais importantes para o reconhecimento da molécula no DBS, o próximo passo consistiu no desenvolvimento de um farmacóforo com cinco pontos, procedendo à avaliação das suas taxas de detecção através da comparação com os farmacóforos anteriores, visando o aumento da taxa de detecção para valores superiores aos registados.

**2.3.3. Construção de Farmacóforos com base em compostos da literatura.** Tendo como base o grupo *Controlo*, onde se encontram presentes moduladores como o tariquidar ou o OC144-093, e substratos com elevada afinidade para a P-gp como a colchicina, daunorrubicina ou tenipósido, foram desenvolvidos dois farmacóforos distintos. A **Figura 9** apresenta o farmacóforo A (subgrupo S6 do *Anexo I*) com três pontos hidrofóbicos, um

ACC/HYD e um ARO/HYD, definido através da utilização das técnicas de elucidação e consenso farmacofórico.

O raio dos pontos farmacofóricos está compreendido entre 1,4 e 1,8 Å e a distância máxima entre pontos foi de 8,2 Å. A percentagem de detecção foi de 95,2% e 90,8% nos grupos *Moduladores* e *Controlo* respectivamente, uma das percentagens mais elevadas registadas. Contudo, foi registada uma percentagem de 39,1% nos falsos-positivos, evidenciando que a sobreposição de dois dos cinco pontos hidrofóbicos pode contribuir para a obtenção de um farmacóforo menos preciso. A definição de um domínio HYD no grupo ACC pode também incrementar a detecção de moléculas sem actividade.

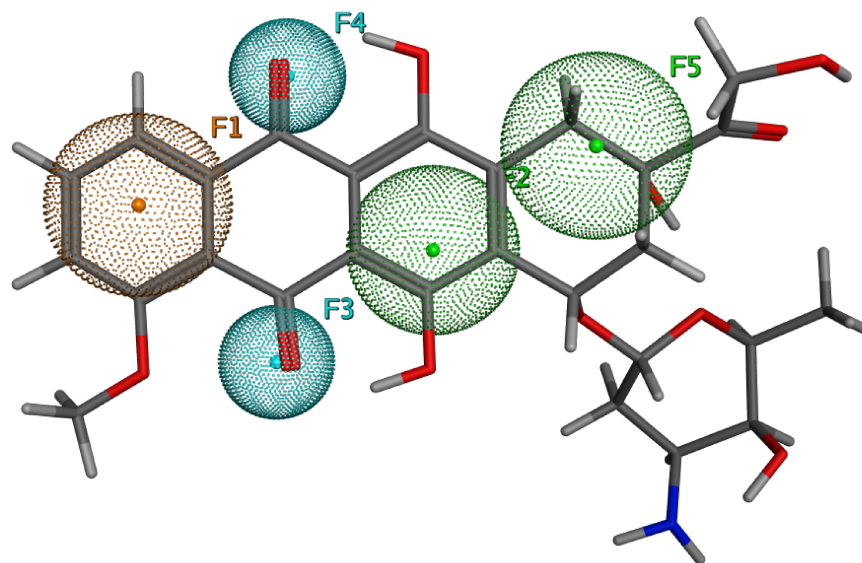
Devido à baixa especificidade revelada pelo farmacóforo A, um consenso farmacofórico do subgrupo 5 (*Anexo I*) do grupo *Controlo* originou um farmacóforo B. Foram igualmente definidos cinco pontos farmacofóricos, dois ACC, dois HYD e um ARO/HYD.



**Figura 9** - OC144-093 com o farmacóforo A. Os pontos farmacofóricos F1, F2 e F5, hidrofóbicos; F4, aromático; F3, hidrofóbico/aceitador de pontes de hidrogénio.

A distância entre os dois grupos ACC é de 6,5 Å, ligeiramente superior ao valor da unidade *Tipo II* definida por Seelig, mantendo a distância entre o domínio ARO e os domínios ACC inferior aos 5,0 Å requeridos. A distância máxima entre todos os domínios é semelhante à registada no farmacóforo A (cerca de 7,9 Å) e apenas o domínio aromático possui características múltiplas. O raio máximo dos pontos hidrofóbicos é de 1,6 Å, definindo-se os ACC com um raio de apenas 1,0 Å (**Figura 10**). Com este novo farmacóforo, as taxas de detecção nos grupo *Controlo* e *Moduladores* sofreram uma redução para 66,4% e 50,0%

respectivamente, com apenas 13,0% de falsos-positivos.



**Figura 10** - Sobreposição da molécula de doxorrubicina no farmacóforo B. F1, hidrofóbico/aromático; F2 e F5, pontos hidrofóbicos; F3 e F4, pontos aceitadores.

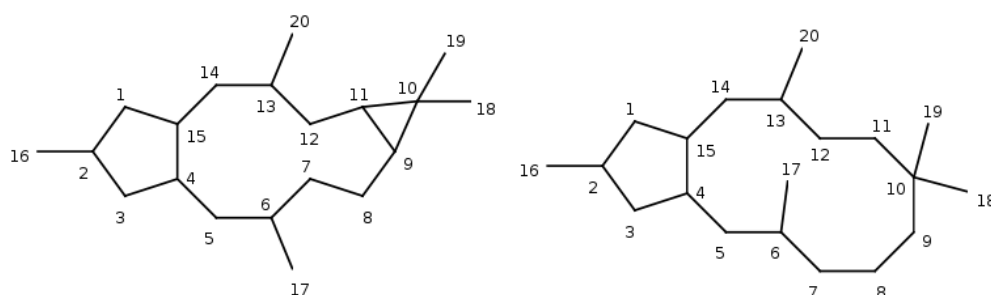
Este decréscimo pode ser explicado pelo facto de em ambos os grupos a distância média entre os dois ACC exceder os 7,0 Å. Concomitantemente, uma grande fracção das moléculas do grupo *Moduladores* possui apenas um único grupo com características ACC. Apenas a presença de um grupo aceitador adicional à distância requerida ou a condensação de um grupo cuja distância seja superior ou inferior ao especificado com uma molécula contendo um maior número de grupos ACC (como a glucose), permite uma distância tal que activa a sua detecção por este farmacóforo em particular. Moléculas mais flexíveis, como os latiranos<sup>24,26</sup> ou os sifolanos<sup>31</sup>, são detectadas numa percentagem superior a 99% uma vez que um segundo aceitador de pontes de hidrogénio está localizado numa cadeia lateral flexível.

Um facto particularmente interessante reside nas conformações detectadas nas moléculas da vinblastina e vincristina. Nas moléculas neutras, os átomos de azoto constituem 100% dos pontos ACC da molécula de vincristina mas apenas 50% nas conformações da vinblastina, em conjunto com átomos de oxigénio ou carbonilos. Após a protonação do azoto a pH fisiológico, apenas a vinblastina é susceptível de ser detectada pelo farmacóforo, maioritariamente devido aos átomos de oxigénio.

Após várias tentativas, o aumento da percentagem de detecção ou a redução do número

de moléculas inactivas detectadas não se demonstrou exequível a partir dos farmacóforos determinados. Uma nova abordagem foi por isso desenvolvida, recorrendo à criação de um farmacóforo a partir de moduladores isolados a partir das espécies de *Euphorbia*. Estes compostos possuem uma origem biossintética comum, sendo constituídos por um esqueleto de 20 carbonos (**Esquema 2**), organizado num anel de ciclopentano fundido com um macrociclo contendo 12 membros (jatrofanos), 11 membros fundidos com um ciclopropano (latiranos) ou como sistemas tetracíclicos. Recentemente, foram igualmente isolados triterpenóides da classe dos cucurbitanos<sup>27</sup>, cujos ensaios demonstraram ser também potentes moduladores do efluxo em linhas celulares multi-resistentes.

**2.3.4. Construção do Farmacóforo com base nos moduladores isolados do género *Euphorbia*.** Tendo por base os latiranos diterpénicos<sup>24</sup> e de acordo com as informações obtidas pelos farmacóforos anteriores, nomeadamente a confirmação das distâncias e disposição espacial dos pontos farmacofóricos, foi possível o desenvolvimento de um novo farmacóforo definido por quatro características.

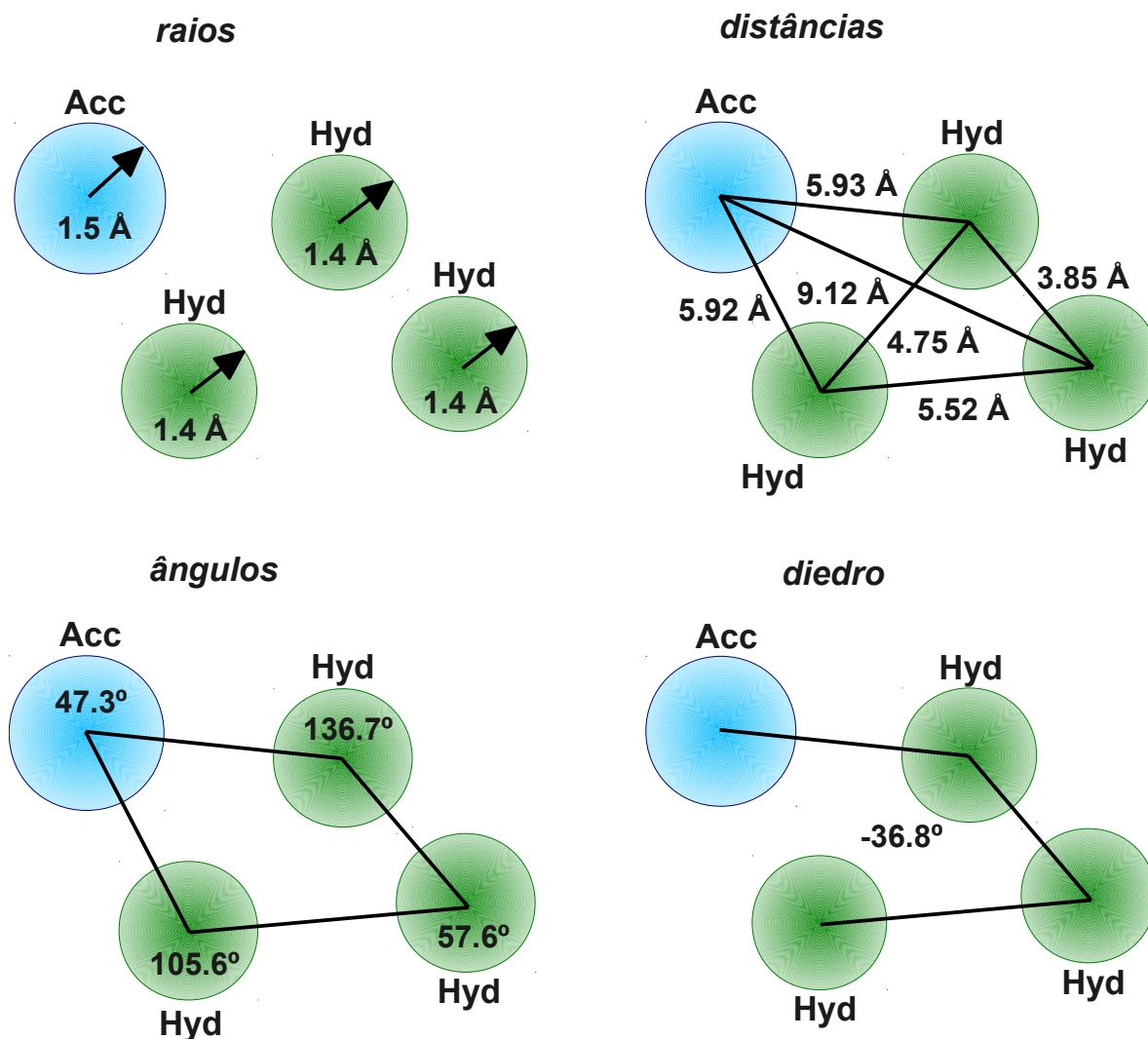


**Esquema 2** - Esqueleto diterpénico dos latiranos utilizados no desenvolvimento do farmacóforo proposto.

O alinhamento das moléculas de esqueleto diterpénico, cuja variação no anel macrocíclico é mínima, revelou a presença da maioria dos pré-requisitos anteriormente definidos. Existem de acordo com o padrão estabelecido por Seelig, no mínimo, uma unidade *Tipo I* e múltiplas unidades *Tipo II*. A distância de 5,0 Å definida por Suzuki (entre os domínios ACC e HYD/ARO) pode igualmente ser respeitada neste conjunto de moléculas. A posição espacial final dos pontos farmacofóricos foi otimizado por forma a obter a máxima percentagem de detecção dentro do subgrupo dos latiranos.

A partir deste farmacóforo, todos os pontos possuem apenas uma única característica. O raio do ACC é de 1,5 Å, enquanto os restantes HYD foram definidos com um raio de 1,4 Å.



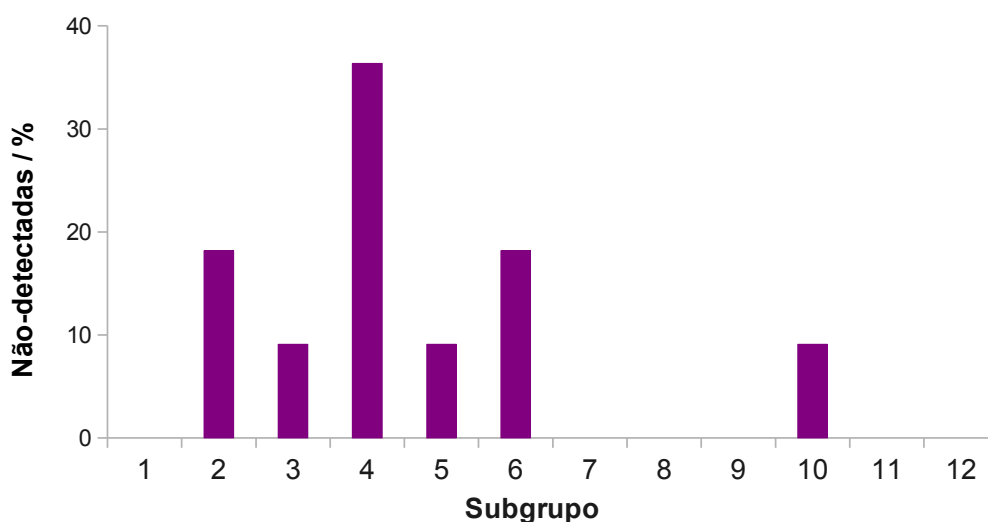


**Esquema 3** - Valores dos raios, distâncias, ângulos e ângulo diedro do farmacóforo desenvolvido a partir do esqueleto latirano.

A distância entre o ponto aceitador de pontes de hidrogénio e o ponto mais próximo é de 5,9 Å, a distância máxima entre pontos é de 9,1 Å e o ângulo entre os três domínios hidrofóbicos é de 57,6° (**Esquema 3**). O facto do ponto aceitador não se encontrar no plano dos domínios hidrofóbicos revelou-se importante, pois o máximo de detecção foi alcançado com um ângulo não superior a 40 a partir do qual a taxa de detecção de inactivos aumenta. Apesar de existirem grupos ACC em número variável, um farmacóforo que respeite as unidades *Tipo I* ou *II* de Seelig não foi obtido e, no âmbito deste trabalho, a existência destas unidades não pode ser considerada como um pré-requisito essencial. O farmacóforo desenvolvido detectou com sucesso a totalidade das moléculas que integram o grupo *Moduladores*, 84,2% do grupo *Controlo* e apenas 19,5% de moléculas inactivas (**Tabela 3**). Uma análise cuidada verificou a detecção efectiva das moléculas de



maior actividade presentes no grupo *Controlo*. Das moléculas que integram os falsos-negativos, 36,4% pertencem à família dos flavonóides (**Gráfico 1** – subgrupo 4), sendo constituídas por moléculas de tamanho relativamente pequeno, com um número reduzido de substituintes e sem grupos hidrofóbicos volumosos ligado à estrutura da cromona

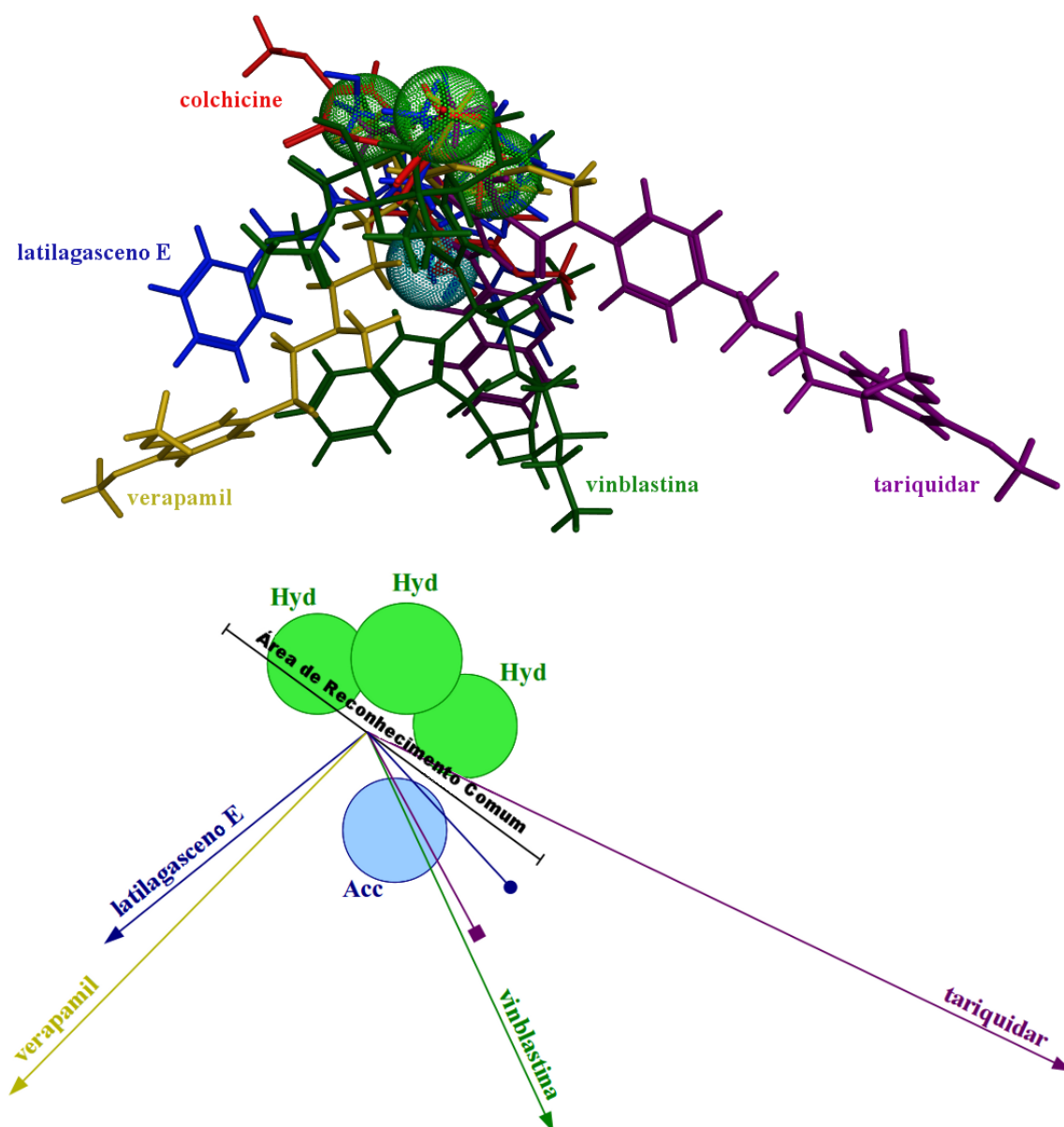


**Gráfico 1** - Distribuição das percentagens das moléculas não detectadas (informação adicional sobre os subgrupos incluído no *Anexo I*).

Estes resultados encontram-se de acordo com estudos anteriores<sup>15,16,37</sup>, corroborando o facto de que os flavonóides e estruturas relacionadas, à excepção dos prenilados, interagem com um local adjacente ao local de ligação do ATP comum às moléculas esteróides, e não por interacção directa com o DBS. Se este subgrupo em particular for ignorado, assistimos a um aumento da percentagem de detecção para 87,5%, uma das mais altas obtidas no presente trabalho.

A existência de um local de ligação comum para múltiplas estruturas no DBS é sugerido por diversos estudos<sup>10,12</sup>, maioritariamente devido ao tamanho da cavidade interna da P-gp e da existência de vários pontos comuns a diversos modelos farmacofóricos<sup>12,38</sup>. Com base no farmacóforo desenvolvido, foi efectuada uma pesquisa das diferentes conformações permitidas para as moléculas vinblastina<sup>1</sup>, latilagasceno E<sup>26</sup>, verapamil<sup>1</sup>, colchicina<sup>39</sup> e tariquidar<sup>40</sup>. A sobreposição das conformações com o menor desvio quadrático médio (RMSD) evidencia os pontos estruturais comuns, detectados por este farmacóforo em particular, o que pode ser observado na **Figura 11**. A molécula de colchicina, que possui as menores dimensões do conjunto, ocupa a área espacial definida pelo farmacóforo, enquanto que a vinblastina, o latilagasceno E, o verapamil e o tariquidar

possuem cadeias laterais substituídas que se projectam a partir da zona de reconhecimento.

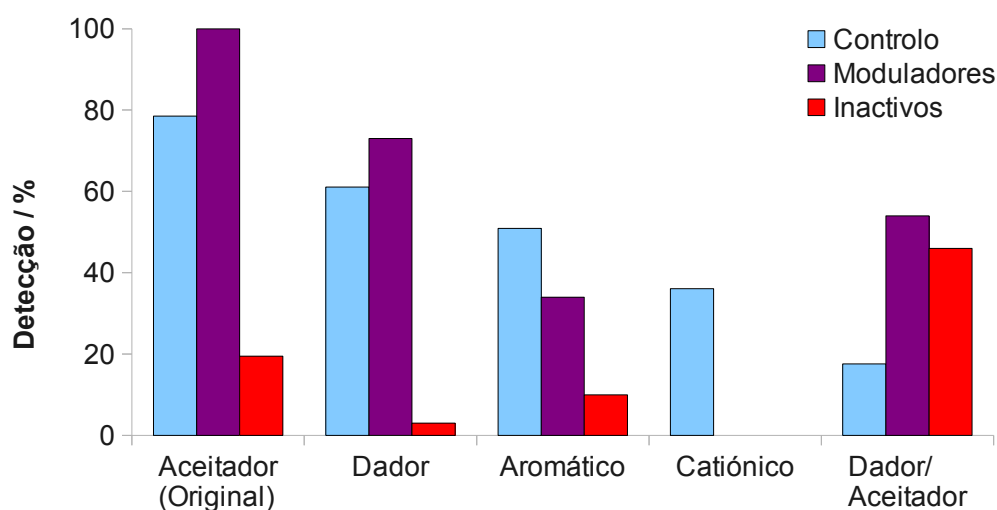


**Figura 11** - Conformações de menor desvio quadrático médio detectadas pelo presente farmacóforo (em cima) e diagrama esquemático da área de reconhecimento definida pelo farmacóforo.

Esta sobreposição clarifica a hipótese de apenas uma pequena parte da molécula ser efectivamente necessária para o reconhecimento, pelo que os restantes grupos contribuirão directamente para a afinidade através da formação de interacções adicionais. A molécula do tariquidar é a que apresenta um eixo maior, projectando-se cerca de 20 Å a partir da área de reconhecimento através de uma cadeia lateral flexível com anéis

aromáticos e grupos ACC. Estes grupos podem estabelecer interacções hidrofóbicas ou pontes de hidrogénio com diferentes resíduos da proteína, um contributo importante para o aumento da afinidade.

Diversos estudos também consideram a existência de pontos dadores (aminas), grupos catiónicos ou aromáticos como características fundamentais para a modulação da actividade da P-gp, pelo que a clarificação da importância do grupo aceitador definido por este farmacóforo foi efectuada através da substituição do aceitador por cada um destes pontos e à análise dos respectivos resultados.



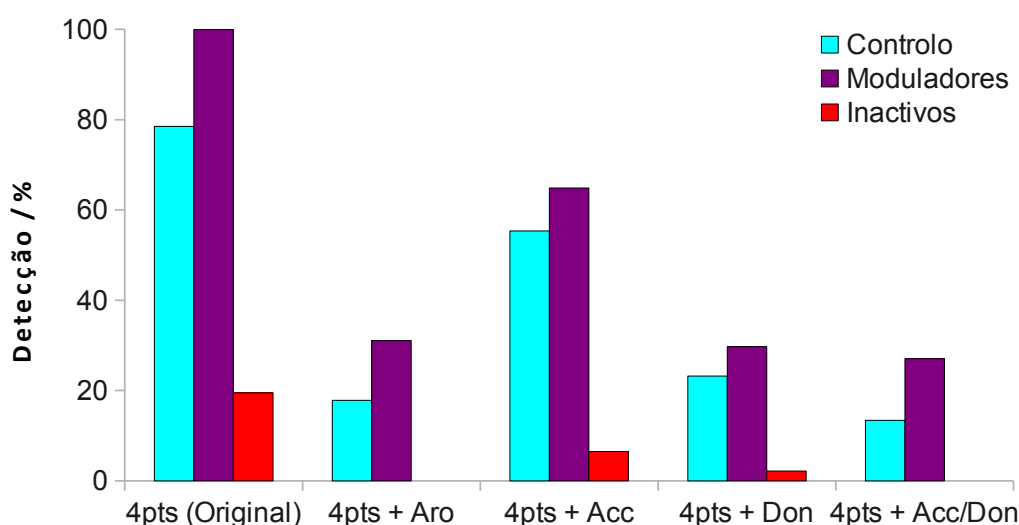
**Gráfico 2** - Impacto na percentagem de detecção com a modificação do ponto aceitador de pontes de hidrogénio por um dador, aromático, catiónico ou dador/aceitador.

A substituição do ponto aceitador por qualquer uma das características acima referidas traduz-se numa diminuição generalizada da percentagem de detecção em todos os grupos (**Gráfico 2**). No grupo *Controlo*, os resultados permanecem acima de 50% para os pontos dador e aromático, mas são bastante inferiores por intermédio da substituição por pontos catiónicos ou simultaneamente dador/aceitador.

Um outro ponto importante a clarificar é a implicação da introdução de um quinto ponto farmacofórico na percentagem de detecção, uma vez que os resultados obtidos no decorrer deste estudo com farmacóforos de cinco pontos não permitem a avaliação do impacto de pontos adicionais. Seelig propôs a existência mínima de dois grupos com capacidade dadora de electrões<sup>6</sup>, Penzoti e Neuhoﬀ propuseram a existência de um domínio aromático que estabeleça interacções  $\pi$ - $\pi$  com resíduos de fenilalanina<sup>41,42</sup>, facto já referido anteriormente por Hait e Aftab<sup>4</sup>. Adicionalmente, Penzoti e Pajeva propuseram

a existência de uma grupo dador de pontes de hidrogénio por forma a aumentar a afinidade para com o transportador<sup>10,42</sup>.

Com base no farmacóforo de quatro pontos desenvolvido, foram introduzidos pontos farmacofóricos adicionais. Um anel aromático, um segundo aceitador, um dador ou um ponto simultaneamente dador e aceitador de pontes de hidrogénio. As posições farmacofóricas foram optimizadas de modo a que permitam a máxima percentagem de detecção. A adição do segundo aceitador obteve o melhor resultado a uma distância de 7,5 Å do primeiro, e não obstante a detecção com sucesso de muitos dos moduladores mais activos, a taxa de detecção no grupo *Controlo* diminuiu para 55,4% (**Gráfico 3**).

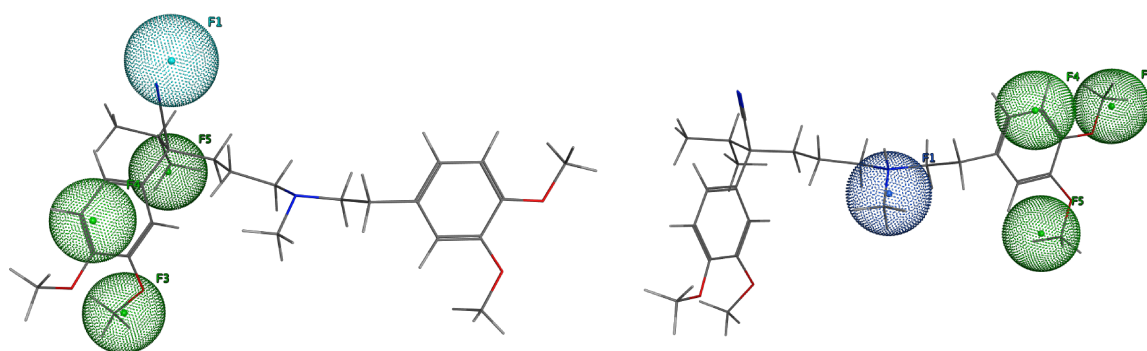


**Gráfico 3** - Impacto nas percentagens de detecção com a adição de um quinto ponto farmacofórico.

A introdução de um grupo ARO junto do ponto aceitador, de acordo com o sugerido por Pajeva *et al.*<sup>19</sup>, diminuiu a percentagem de detecção para 17,8%. O mesmo foi registado com a introdução de grupos DON ou ACC/DON propostos por outros estudos<sup>10,42</sup>, com detecções de 22,2% e 13,4% no grupo *Controlo*, respectivamente. A adição do ponto ACC/DON não permitiu que muitos dos moduladores presentes em ambos os grupos fossem detectados. Contudo, os grupos hidroxilo detectados como aceitadores no farmacóforo de quatro pontos proposto possuem características dadoras e aceitadoras em simultâneo. A adição do ponto DON, não obstante a grande diminuição nos resultados, consegue detectar um grande número de moléculas com marcada actividade moduladora. Este facto confirma a presença de grupos dadores ou aceitadores adicionais como não essenciais para o reconhecimento molecular mas, quando presentes na molécula, ajudam

a aumentar a afinidade para o transportador. Similarmente, a introdução de um grupo aromático reduziu o número de moléculas detectadas no grupo *Controlo* para 17,8% mas permitiu a identificação de moduladores como o tariquidar, OC144-093 ou LY335979. Os resultados obtidos demonstram que, à semelhança dos pontos descritos anteriormente, também um domínio aromático é um factor importante para o aumento da afinidade da molécula no local de ligação, por interações  $\pi$ - $\pi$ , electrostáticas ou por indução da formação de dipolos. Finalmente, a adição de um ponto catiónico baixa a percentagem de detecção para 6,3%, não identificando qualquer molécula no grupo *Moduladores*.

O estado de protonação das moléculas foi igualmente sujeito a análise, devido ao facto de existirem grupos amina secundários e terciários cujo  $pK_a$  favorece a sua protonação a pH fisiológico. Não foram observadas alterações significativas nas percentagens de detecção, apenas elevando ligeiramente o número de moléculas detectadas no grupo *Controlo* quando é definido um grupo dador no padrão farmacofórico.



**Figura 12** - Conformações de RMSD mais baixas do verapamil com um ponto farmacofórico aceitador (azul-claro, à esquerda) ou catiónico (azul-escuro, à direita).

Curiosamente, e no caso particular do verapamil (**Figura 12**), verifica-se que a detecção pelos farmacóforos contendo domínios aceitadores e catiónicos ocorre em zonas diferentes da molécula. Este facto parece suportar alguns dados que referem a capacidade do DBS detectar formas neutras e protonadas da mesma molécula e, consequentemente, com diferentes afinidades e em diferentes zonas do DBS.

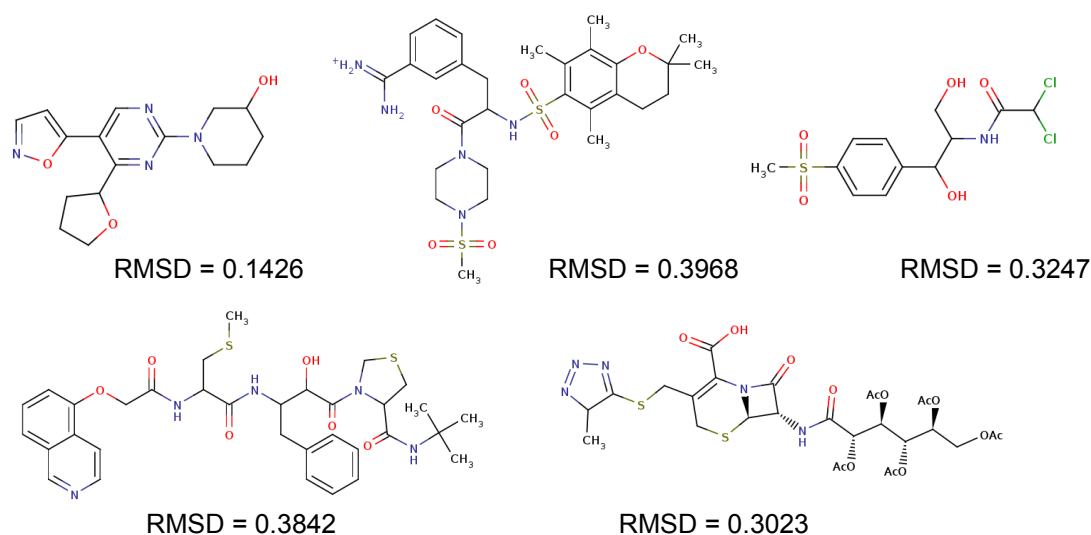
**2.3.5. Screening Virtual.** Um dos métodos que permite a avaliação do potencial do farmacóforo desenvolvido é a sua aplicação através de métodos de *screening* virtual para a identificação de novas moléculas com potencial actividade moduladora. Esta técnica permite a análise rápida *in silico* de uma ou várias bases de dados pré-existentes,

permitindo a identificação de compostos, moléculas ou fragmentos que possam servir como base inicial (“scaffold”) na construção de novas moléculas com maior actividade<sup>43,44</sup>. Os resultados de *screening* efectuados na base de dados disponibilizada pelo MOE 2009.10 encontram-se descritos na **Tabela 4**.

**Tabela 4** – Percentagens de detecção, pelo farmacóforo desenvolvido, de novas moléculas na base de dados MOE 2009.10. N é o número de compostos total da base de dados.

Farmacóforo	4pts	4pts+Acc	4pts+Aro	4pts+Don	4pts+Acc/Don
MOE Database (N=152064)	11,9%	5,5%	0,9%	3,0%	0,2%

Na **Figura 13** encontram-se representadas algumas das moléculas identificadas que podem ser utilizadas como *scaffold* para o desenvolvimento de novos inibidores.



**Figura 13** - Estruturas detectadas através da técnica de *screening virtual* com recurso ao farmacóforo desenvolvido, e correspondente RMSD.

O farmacóforo testado detecta 11,9% das 152.000 moléculas testadas, o que corresponde a mais de 18.000 estruturas. A utilização dos restantes farmacóforos revela um padrão semelhante ao observado anteriormente, sendo a segunda maior percentagem de detecção obtida pelo farmacóforo com um ACC adicional (5,5%), seguido pelo DON (3,0%) e pelo ARO (0,9%). Considerando a percentagem de falsos positivos durante o desenvolvimento do farmacóforo, estima-se que aproximadamente 3500 moléculas do total detectado não possuam actividade.

**2.4. Discussão dos Resultados.** O presente estudo foi realizado com o objectivo de desenvolver um farmacóforo optimizado para a detecção de moduladores da

Glicoproteína-P, passível de ser utilizado como ferramenta de trabalho que permita a descoberta e desenvolvimento de novos moduladores da multi-resistência ou para o aumento da selectividade dos compostos existentes, contribuindo desta forma para uma melhor compreensão do mecanismo de efluxo. Através da utilização de uma base de dados contendo 272 moléculas, foi criado um farmacóforo que obteve com sucesso taxas de detecção elevadas em compostos com actividade moduladora da P-gp, uma proteína de efluxo pertencente ao grupo dos transportadores ABC. As moléculas encontram-se organizadas em três grupos diferentes (*Controlo, Moduladores e Inactivos*), identificadas de acordo com a actividade demonstrada, pelo que os resultados alcançados corroboram a importância de um núcleo hidrofóbico como requisito fundamental para a interacção com o DBS. Estes dados são concordantes com um estudo recente que elucidou a estrutura cristalográfica da P-gp murina, onde foram identificados resíduos hidrofóbicos de valina e fenilalanina em zonas centrais do DBS, partilhados por três zonas distintas de reconhecimento<sup>38</sup>.

A presença de grupos aceitadores de pontes de hidrogénio é igualmente crítico, permitindo uma melhoria na afinidade através do aumento do número de interacções com resíduos como a histidina, arginina ou serina. A presença de um anel aromático também contribui para o aumento da afinidade para o DBS, nomeadamente através de interacções  $\pi$ - $\pi$ , electrostáticas ou por formação de dipolos com fenilalaninas ou tirosinas. O estudo de Aller *et al.* refere a existência de ambos os tipos de resíduos no interior da cavidade central da P-gp, com um maior predomínio hidrofóbico na zona superior em contraste com os mais polares da zona inferior, alguns potencialmente carregados<sup>38</sup>. A análise desta informação corrobora as conclusões do nosso estudo em como o principal modo de interacção da moléculas com o DBS é predominantemente de carácter hidrofóbico, tendo os grupos aromáticos, dadores e aceitadores responsabilidade no aumento da afinidade que algumas moléculas apresentam.

O farmacóforo proposto é composto por três domínios hidrofóbicos e um aceitador de pontes de hidrogénio e foi desenvolvido com base em informações obtidas de estudos anteriores e validado através de farmacóforos descritos na literatura, possuindo no entanto um maior espectro de detecção de moléculas com propriedades moduladoras da actividade da P-gp. Permite a detecção de 100% das moléculas presentes no grupo

*Moduladores* (isoladas e descritas em estudos anteriores deste grupo de investigação) mas também de 84,2% dos moduladores descritos na literatura, possuindo no entanto a especificidade adequada para evitar a detecção de moléculas desprovidas de actividade. Um estudo recente identificou, através de tecnologias envolvendo campos de interacção moleculares, apenas zonas hidrofóbicas e um único grupo aceitador de pontes de hidrogénio como características essenciais ao reconhecimento por parte da P-gp, um resultado similar ao observado e que permite a validação das informações apresentadas por este trabalho. No entanto, não considerou a influência do estado de protonação das moléculas nem utilizou os moduladores isolados das espécies *Euphorbia* no decurso do estudo<sup>45</sup>.

A introdução de um quinto ponto farmacofórico reduz a percentagem de detecção em todos os grupos, sendo o melhor resultado obtido com a adição de um segundo ACC. No entanto, é importante referir que a maior parte dos moduladores são detectados com sucesso em todos os farmacóforos de cinco pontos (com excepção do farmacóforo contendo um ponto dador/aceitador), o que realça a importância da existência de grupos aromáticos e dadores no aumento da afinidade das moléculas para com a P-gp.



## REFERÊNCIAS

- (1) T. Tsuruo, H. Lida, S. Tsukagoshi, Y. Sakurai, Overcoming of Vincristine Resistance in P388 Leukemia in Vivo and in Vitro through Enhanced Cytotoxicity of Vincristine and Vinblastine by Verapamil., *Cancer Research*, **1981**, 41, 1967-1972.
- (2) J.H. Van Drie, Monty Kier and the Origin of the Pharmacophore Concept., *Internet Electronic Journal of Molecular Design*, **2007**, 6, 271-279.
- (3) H.L. Pearce, A.R. Safa, N.J. Bach, M.A. Winter, M.C. Cirtain, W.T. Beck, Essential features of the P-glycoprotein pharmacophore as defined by a series of reserpine analogs that modulate multidrug resistance., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **1989**, 86, 5128-5132.
- (4) W.N. Hait, D.T. Aftab, Rational design and pre-clinical pharmacology of drugs for reversing multidrug resistance., *Biochemical Pharmacology*, **1992**, 43, 103-107, doi:10.1016/0006-2952(92)90667-8.
- (5) A. Seelig, R. Gottschlich, R.M. Devant, A method to determine the ability of drugs to diffuse through the blood-brain barrier., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **1994**, 91, 68-72.
- (6) A. Seelig, How does P-glycoprotein recognizes its substrates?, *European Journal of Biochemistry*, **1998**, 36, 50-54.
- (7) T. Suzuki, N. Fukazawa, K. San-nohe, Structure-Activity Relationship of Newly Synthesized Quinoline Derivatives for Reversal of Multidrug Resistance in Cancer., *Journal of Medicinal Chemistry*, **1997**, 40, 2047-2052.
- (8) A. Ramu, N. Ramu, Reversal of multidrug resistance by phenothiazines and structurally related compounds., *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **1992**, 30, 165-173.
- (9) G.F. Ecker, M. Huber, D. Schmid, P. Chiba, The Importance of a Nitrogen Atom in Modulators of Multidrug Resistance., *Molecular Pharmacology*, **1999**, 56, 791-796.
- (10) I.K. Pajeva, M. Wiese, Pharmacophore Model of Drugs Involved in P-Glycoprotein Multidrug Resistance: Explanation of Structural Variety (Hypothesis)., *Journal of Medicinal Chemistry*, **2002**, 45, 5671-5686, doi:10.1021/jm020941h.
- (11) N.R. Tawari, S. Bag, M.S. Degani, Pharmacophore mapping of a series of pyrrolopyrimidines, indolopyrimidines and their congeners as multidrug-resistance-associated protein (MRP1) modulators., *Journal of Molecular Modelling*, **2008**, 14, 911-921, doi:10.1007/s00894-008-0330-z.
- (12) A. Garrigues, N. Loiseau, M. Delaforge, J. Ferté, M. Garrigos, F. André, S. Orlowski, Characterization of two pharmacophores on the multidrug transporter P-glycoprotein., *Molecular Pharmacology*, **2002**, 62, 1288-1298.
- (13) S. Ekins, R.B. Kim, B.F. Leake, A.H. Dantzig, E.G. Schuetz, L.-B. Lan, K. Yasuda, R.L. Shepard, M.A. Winter, J.D. Schuetz, J.H. Wikel, S.A. Wrighton, Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships of Inhibitors of P-Glycoprotein., *Molecular Pharmacology*, **2002**, 61, 964-973.
- (14) R.-B. Wang, C.-L. Kuo, L.L.-M. Lien, E.J.-C. Lien, Structure-activity relationship:

- analyses of p-glycoprotein substrates and inhibitors., *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, **2003**, 28, 203-228.
- (15) G. Conseil, H. Baubichon-Cortay, G. Dayan, J.-M. Jault, D. Barron, A.D. Pietro, Flavonoids: A class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **1998**, 95, 9831-9836.
  - (16) G. Conseil, A. Decottignies, J.-M. Jault, G. Comte, D. Barron, A. Goffeau, A.D. Pietro, Prenyl-Flavonoids as Potent Inhibitors of the Pdr5p Multidrug ABC Transporter from *Saccharomyces cerevisiae*., *Biochemistry*, **2000**, 39, 6910-6917, doi:10.1021/bi000040f.
  - (17) R. Didziapetris, P. Japertas, A. Avdeef, A. Petrauskas, R. Didziapetris, Classification Analysis of P-Glycoprotein Substrate Specificity., *Journal of Drug Targeting*, **2003**, 11, 391-406, doi:10.1080/10611860310001648248.
  - (18) G.A. Altenberg, G. Young, J.K. Horton, D. Glass, J.A. Belli, L. Reuss, Changes in intra- or extracellular pH do not mediate P-glycoprotein-dependent multidrug resistance., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **1993**, 90, 9735-9738.
  - (19) I.K. Pajeva, C. Globisch, M. Wiese, Combined Pharmacophore Modeling, Docking, and 3D QSAR Studies of ABCB1 and ABCC1 Transporter Inhibitors., *ChemMedChem*, **2009**, 4, 1883-1896, doi:10.1002/cmdc.200900282.
  - (20) I.K. Pajeva, M. Wiese, Structure-activity relationships of tariquidar analogs as multidrug resistance modulators., *AAPS journal*, **2009**, 11, 435-44, doi:10.1208/s12248-009-9118-z.
  - (21) C. Valente, M.-J.U. Ferreira, P.M. Abreu, N. Gyémánt, K. Ugocsai, J. Hohmann, J. Molnár, Pubescenes, jatrophone diterpenes, from *Euphorbia pubescens*, with multidrug resistance reversing activity on mouse lymphoma cells., *Planta Med*, **2004**, 70, 81-84, doi:10.1055/s-2004-815464.
  - (22) A.M. Madureira, N. Gyémánt, J.R. Ascenso, P.M. Abreu, J. Molnár, M.-J.U. Ferreira, Euphoportlandols A and B, tetracyclic diterpene polyesters from *Euphorbia portlandica* and their anti-MDR effects in cancer cells., *Journal of Natural Products*, **2006**, 69, 950-953, doi:10.1021/np060046r.
  - (23) A.M. Madureira, M.-J.U. Ferreira, N. Gyémánt, K. Ugocsai, J.R. Ascenso, P.M. Abreu, J. Hohmann, J. Molnár, Rearranged jatrophone-type diterpenes from *euphorbia* species. Evaluation of their effects on the reversal of multidrug resistance., *Planta Med*, **2004**, 70, 45-49, doi:10.1055/s-2004-815454.
  - (24) N. Duarte, N. Gyémánt, P.M. Abreu, J. Molnár, M.-J.U. Ferreira, New macrocyclic lathyrane diterpenes, from *Euphorbia lagascae*, as inhibitors of multidrug resistance of tumour cells., *Planta Med*, **2006**, 72, 162-168, doi:10.1055/s-2005-873196.
  - (25) N. Duarte, A. Járdánházy, J. Molnár, A. Hilgeroth, M.-J.U. Ferreira, Synergistic interaction between p-glycoprotein modulators and epirubicine on resistant cancer cells., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2008**, 16, 9323-9330, doi:10.1016/j.bmc.2008.08.071.

- (26) N. Duarte, A. Varga, G. Cherepnev, R. Radics, J. Molnár, M.-J.U. Ferreira, Apoptosis induction and modulation of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by new macrocyclic lathyrane-type diterpenoids., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2007**, *15*, 546-54, doi:10.1016/j.bmc.2006.09.028.
- (27) C. Ramallete, J. Molnár, S. Mulhovo, V.E. Rosário, M.-J.U. Ferreira, New potent P-glycoprotein modulators with the cucurbitane scaffold and their synergistic interaction with doxorubicin on resistant cancer cells., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, *17*, 6942-6951, doi:10.1016/j.bmc.2009.08.020.
- (28) C. Ramallete, T.A. Mansoor, S. Mulhovo, J. Molnár, M.-J.U. Ferreira, Cucurbitane-Type Triterpenoids from the African Plant *Momordica balsamina*., *Journal of Natural Products*, **2009**, *72*, 2009-2013, doi:10.1021/np900457u.
- (29) J. Zhang, F. Zhou, X. Wu, Y. Gu, H. Ai, Y. Zheng, Y. Li, X. Zhang, G. Hao, J. Sun, Y. Peng, G. Wang, 20(S)-ginsenoside Rh2 noncompetitively inhibits P-glycoprotein in vitro and in vivo: a case for herb-drug interactions., *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **2010**, *38*, 2179-87, doi:10.1124/dmd.110.034793.
- (30) D. Castagnolo, L. Contemori, G. Maccari, S.I. Avramova, A. Neri, G. Sgaragli, M. Botta, From Taxuspine X to Structurally Simplified Taxanes with Remarkable P-Glycoprotein Inhibitory Activity., *ACS Medical Chemical Letters*, **2010**, *1*, 416-421, doi:10.1021/ml100118.
- (31) S. Jain, I. Abraham, P. Carvalho, Y.-H. Kuang, L.A. Shaala, D.T.A. Youssef, M.A. Avery, Z.-S. Chen, K.A.E. Sayed, Sipholane Triterpenoids: Chemistry, Reversal of ABCB1/P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance, and Pharmacophore Modeling., *Journal of Natural Products*, **2009**, *72*, 1291-1298, doi:10.1021/np900091y.
- (32) G. Corea, A.D. Pietro, C. Dumontet, E. Fattorusso, V. Lanzotti, Jatrophone diterpenes from *Euphorbia* spp. as modulators of multidrug resistance in cancer therapy., *Phytochemical Review*, **2009**, *8*, 431-447, doi:10.1007/s11101-009-9126-8.
- (33) *Molecular Operating Environment (MOE) v2009.10*, Chemical Computing Group Inc, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, **2009**.
- (34) T.A. Halgren, MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies., *Journal of Computational Chemistry*, **1999**, *20*, 720-729, doi:10.1002/(SICI)1096-987X(199905)20:7<720::AID-JCC7>3.0.CO;2-X.
- (35) T.A. Halgren, MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries., *Journal of Computational Chemistry*, **1999**, *20*, 730-748, doi:10.1002/(SICI)1096-987X(199905)20:7<730::AID-JCC8>3.0.CO;2-T.
- (36) Y. Raviv, H.B. Pollard, E.P. Bruggemann, I. Pastan, M.M. Gottesman, Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells., *Journal of Biological Chemistry*, **1990**, *265*, 3975-3980.
- (37) A. Boumendjel, A.C. Beney, N. Deka, A.M. Mariotte, M.A. Lawson, D. Trompier, H. Baubichon-cortay, A.D. Pietro, 4-Hydroxy-6-methoxyaurones with High-Affinity Binding to Cytosolic Domain of P-Glycoprotein., *Chemical and Pharmacological Bulletin*, **2002**, *50*, 854-856.

- (38) S.G. Aller, J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, P.M. Harrell, Y.T. Trinh, Q. Zhang, I.L. Urbatsch, G. Chang, Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding., *Science*, **2009**, 323, 1718-1722, doi:10.1126/science.1168750.
- (39) R. Juliano, V. Ling, A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants., *Biochimica et Biophysica Acta*, **1976**, 455, 152-162, doi:10.1016/0005-2736(76)90160-7.
- (40) P. Mistry, A.J. Stewart, W. Dangerfield, S. Okiji, C. Liddle, D. Bootle, J.A. Plumb, D. Templeton, P. Charlton, In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576., *Cancer research*, **2001**, 61, 749-58.
- (41) S. Neuhoff, P. Langguth, C. Dressler, T.B. Andersson, C.-G. Regardh, H. Spahn-Langguth, Affinities at the verapamil binding site of MDR1-encoded P-glycoprotein: drugs and analogues, stereoisomers and metabolites., *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **2000**, 38, 168-179.
- (42) J.E. Penzotti, M.L. Lamb, E. Evensen, P.D.J. Grootenhuis, A computational ensemble pharmacophore model for identifying substrates of P-glycoprotein., *Journal of Medicinal Chemistry*, **2002**, 45, 1737-1740.
- (43) D. Horvath, In *Methods in Molecular Biology*, Vol. 672, J. Bajorath, Ed., Springer Science+Business Media, **2011**, pages 261-298.
- (44) J.M. Rollinger, H. Stuppner, T. Langer, Virtual screening for the discovery of bioactive natural products., *Progress in Drug Research*, **2008**, 65, 211,211-213,249, doi:10.1007/978-3-7643-8117-2.
- (45) F. Broccatelli, E. Carosati, A. Neri, M. Frosini, L. Goracci, T.I. Oprea, G. Cruciani, A novel approach for predicting P-plycoprotein (ABCB1) inhibition using molecular interaction fields., *Journal of Medicinal Chemistry*, **2011**, 54, 1740-1751, doi:10.1021/jm101421d.

## *Capítulo III*

### *Simulação Computacional da Glicoproteína-P*



**3.1. Introdução.** O estudo das proteínas transmembranares, nas quais a P-gp se encontra integrada, reveste-se de grande importância devido às funções fisiológicas em que estas participam. Constituindo 30% dos genes conhecidos<sup>1</sup>, são consideradas alvos terapêuticos desejáveis para os quais podem ser desenvolvidos novos compostos com interesse farmacológico. Nesta classe encontram-se incluídos receptores, canais iónicos, enzimas ou transportadores, num total de 298 mapeadas desde 1985<sup>2,3</sup>. Este é um número bastante escasso considerando as mais de 74.000 existentes<sup>4</sup>, principalmente devido à dificuldade na obtenção de cristais deste tipo de estruturas. Adicionalmente, a sua utilização experimental enfrenta grandes limitações, nomeadamente a necessidade deste tipo de proteínas se encontrarem inseridas em membranas celulares ou vesículas sintéticas por forma a manterem a sua actividade<sup>5,6</sup>. Perante este facto, a utilização de modelos computacionais para a simulação destes componentes permite a melhor compreensão de alguns dos dados obtidos através dos procedimentos experimentais. Em relação à P-gp, um modelo computacional pode ser utilizado para esclarecer várias interrogações sobre a estabilidade da estrutura, os locais de ligação dos substratos e moduladores, modelos de translocação e a própria interacção com a membrana. Contudo, existem algumas condicionantes a considerar na construção destes tipos de modelos informáticos. A estrutura da proteína é uma das primeiras questões a considerar devido ao facto da qualidade da estrutura secundária da proteína depender da resolução a partir do qual foi obtida. Estudos concluíram que a qualidade das estruturas e, consequentemente, das simulações é superior quando estas são obtidas por métodos cristalográficos, correlacionando-se directamente com a resolução do cristal a partir do qual foram obtidas<sup>7,8</sup>. A resolução dos modelos obtidos por homologia encontra-se entre a dos modelos cristalográficos e dos de microscopia electrónica, apresentando no entanto problemas devido ao facto da mutação específica nos resíduos da sequência primária poder introduzir erros na estrutura secundária da proteína. Por este motivo, vários modelos de homologia da P-gp foram apresentados nos últimos anos, baseados nos transportadores bacterianos Sav1866<sup>9</sup>, BtuCD<sup>10</sup> e MsbA<sup>11</sup>, sendo que a maioria não provou a sua adequabilidade como modelo para este transportador<sup>12</sup>.

A qualidade e validade do modelo computacional encontra-se também directamente relacionado com o campo de forças utilizado na simulação. Designa-se por “campo de

forças" (*force-field*) o conjunto das funções energéticas e dos parâmetros responsáveis pela parametrização empírica das interações ligantes e não-ligantes entre os átomos do sistema, através do cálculo numérico das leis da mecânica clássica<sup>13</sup>. A energia do sistema de partículas pode ser definida de um modo simples pelo Hamiltoniano ( $\mathcal{H}$ ):

$$\mathcal{H} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \frac{p_i^2}{m_i} + \phi \quad (1)$$

O primeiro termo da equação relaciona o *momentum* ( $p_i$ ) e a massa ( $m_i$ ) da partícula para calcular a sua energia cinética, enquanto que o segundo ( $\phi$ ) corresponde à energia conformacional (potencial), podendo ser subdividido em duas contribuições independentes,

$$\phi = \sum_{inter} \phi_{inter} + \sum_{intra} \phi_{intra} \quad (2)$$

As interações ligantes ( $\phi_{intra}$ ) seriam constituídas pelas energias referentes às contribuições de diferentes membros de acordo com o somatório

$$\phi_{intra} = \sum_{ligações} \phi_i(r) + \sum_{ângulos} \phi_a(\theta) + \sum_{torções} \phi_d(\Phi) + \sum_{diedros\ impróprios} \phi_p(\chi) + \dots \quad (3)$$

onde se incluem as deformações dos comprimentos de ligação e ângulos, torções e saídas do plano (*diedros impróprios*). Já as interações não ligantes ( $\phi_{inter}$ ) são representadas por

$$\phi_{inter} = \sum_{elec} \phi_{electrostático} + \sum_{ind} \phi_{indutivo} + \sum_{disp} \phi_{dispersivo} + \sum_{c. alcance} \phi_{curto alcance} \quad (4)$$

Nesta equação, é frequente apenas o cálculo dos dois primeiros membros da equação. A utilização da Lei de Coulomb e das interações de van der Waals, através do potencial de Lennard-Jones<sup>14,15</sup>, dá então origem à equação

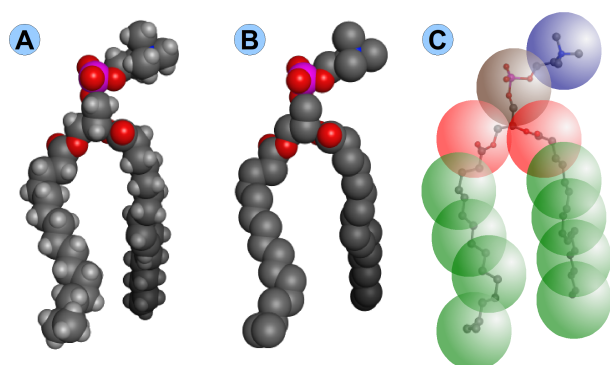
$$\phi_{inter} = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{4 \pi \epsilon_0 r_{ij}} + 4 \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (5)$$

Torna-se assim possível o cálculo da energia e o cálculo das forças exercidas sobre cada partícula e consequentemente, a partir das suas coordenadas cartesianas e da energia potencial, determinar o movimento de cada uma. No entanto, este tipo de simulações encontra-se limitadas pela utilização de aproximações empíricas para o cálculo das forças, não sendo possível a reprodução de efeitos quânticos como a formação ou quebra de ligações<sup>13</sup>.



Cada molécula presente no sistema possui uma parametrização própria, contendo parâmetros para a massa, carga atômica parcial e valores ideais para os comprimentos de ligação, ângulos e torções. Estes dados são obtidos a partir de dados experimentais (estruturas moleculares, constantes de força, propriedades dinâmicas e/ou estruturais) ou cálculos quânticos (semi-empíricos ou *ab initio*). Podem ainda ser definidos parâmetros adicionais como diedros impróprios quando presentes, por exemplo, estruturas aromáticas ou insaturadas. As ligações podem ser calculadas mantendo o comprimento de ligação fixo através de algoritmos como o SHAKE<sup>16</sup> e o LINCS<sup>17,18</sup> ou, a serem permitidas oscilações, frequentemente através da utilização de um potencial harmónico. Este tipo de potencial é de igual modo aplicado aos ângulos e diedros impróprios, sendo os ângulos diedros calculados através de uma série de Fourier em co-senos. Os parâmetros de Lennard-Jones, independentes do tipo de átomo, são transferíveis entre diferentes moléculas sendo apenas necessário a definição do valor numérico no raio de corte (*cut-off*) a utilizar, mas a carga parcial depende dos átomos aos quais este se encontra ligado, pelo que necessitam de ser calculadas *a priori*<sup>19</sup>. Estas cargas são depois tratadas no decorrer da simulação através da utilização de algoritmos como o PME<sup>20,21</sup> para as interacções electrostáticas a longa distância, especificando um valor para o raio de corte no tratamento das interacções de curto alcance.

A escolha do campo de forças depende do sistema a simular, tendo em consideração as estruturas biológicas, os átomos existentes no sistema, as propriedades a estudar e, igualmente importante, a capacidade computacional disponível, devido principalmente ao facto do tamanho do sistema influenciar directamente a velocidade do cálculo.



**Figura 14** - Representação do POPC de acordo com o modelo "all-atom" (A), "united-atom" (B) e "coarse-grained" (C).

Actualmente, os campos de forças existentes em dinâmica molecular distribuem-se por três categorias principais. Os campos de força "all-atom" (**Figura 14-A**) incluem aqueles em que todas as partículas se encontram explícitas, tendo como exemplos o AMBER<sup>22-24</sup>, OPLS<sup>25,26</sup> e CHARMM<sup>27-29</sup>, aplicados frequentemente em

simulações de proteínas e ácidos nucleicos. Alternativamente, e quando existem limitações na capacidade de cálculo, os campos de força “united-atom” (**Figura 14-B**) são uma alternativa a ter em conta. Os hidrogénios encontram-se condensados no átomo de carbono ao qual se encontram ligados formando unidades funcionais indivisíveis, sendo o exemplo mais representativo o campo de forças GROMOS<sup>30-34</sup>. Alguns átomos de hidrogénio não podem ser condensados, como os existentes nos grupos álcool (-OH) ou amina (-NH<sub>x</sub>), pois as interações destes grupos com as moléculas de solvente ou com outros átomos não polares é diferente, condicionando a estabilidade da estrutura secundária da proteína<sup>30</sup>. Por este motivo, as versões mais recentes destes campos de forças também não procedem à condensação dos hidrogénios aromáticos, sendo apenas aplicável aos alifáticos<sup>34</sup>. Mais recentemente, surgiu uma nova abordagem cuja inovação passa por juntar diversos grupos de átomos numa única unidade, conferindo um aspecto descontínuo ao sistema e designando-se de “coarse-grained”, de que é exemplo o campo de forças MARTINI (**Figura 14-C**)<sup>35</sup>.

No caso da P-gp, e apesar de todos os campos de forças se encontrarem validados para a simulação de proteínas e ácidos nucleicos em fase aquosa, por esta se tratar de uma proteína de membrana a simulação deve obrigatoriamente incluir uma membrana lipídica e, conseqüentemente, a parametrização para as moléculas do(s) fosfolípido(s) utilizados, algo para o qual apenas o CHARMM possui parametrização original<sup>36</sup>. Nos restantes campos de forças, sobretudo nos OPLS-AA e GROMOS, existem parametrizações adicionais que é possível adicionar ao sistema, permitindo a utilização deste tipo de moléculas. Um dos primeiros estudos a utilizar com sucesso lípidos em simulações de dinâmica molecular foi realizado por Berger *et al.*<sup>37</sup> com o 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) com recurso a simulações desenvolvidas a partir de moléculas de pentadecano. Estas simulações permitiram a correcta reprodução da densidade e calor de vaporização, obtendo-se uma área por lípido ( $A_L$ ) próxima do valor experimental. Este lípido foi amplamente utilizado em simulações de dinâmica molecular, embora alguns estudos mais recentes indiquem que algumas das propriedades não são reproduzidas com suficiente exactidão, quando as mesmas são comparadas com os resultados experimentais<sup>38,39</sup>. Na tentativa de corrigir algumas destas propriedades, foram efectuados estudos posteriores que apresentaram parametrizações alternativas visando a reprodução

correcta de parâmetros com a  $A_L^{40}$ ,  $V_L^{41,42}$ , propriedades na fase fluida<sup>38,43-45</sup> e solvatação<sup>34,44,45</sup>.

Com este trabalho, pretende-se construir uma simulação computacional a partir da estrutura cristalográfica murina e recolher novos dados que permitam avaliar a estabilidade estrutural e a importância da região de ligação em falta, obtendo no final uma estrutura estável que possa ser utilizada em estudos posteriores de homologia e *docking*. Devido à importância do ambiente hidrofóbico para a estabilização da estrutura e actividade deste transportador, o sistema computacional inclui uma membrana, tendo sido considerados diversos fosfolípidos e diferentes parametrizações por forma a avaliar propriedades como  $A_L$ ,  $V_L$ , fluidez das cadeias hidrofóbicas dos fosfolípidos, espessura da membrana e densidades parciais do sistema. Este estudo prévio permitiu a avaliação do tipo de lípido mais adequado para a estabilização da estrutura secundária da proteína, por forma a obter simulações precisas que reproduzam fielmente o comportamento da Glicoproteína-P.

### 3.2. Metodologia

**3.2.1 Estruturas iniciais e *software*.** A estrutura da P-gp foi obtida através do *Protein Data Bank* ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org))<sup>4</sup> pela identificação do respectivo código (3G5U). As membranas lipídicas, previamente equilibradas para utilização no campo de forças GROMOS96 53a6, foram obtidas a partir da página web mantida por D. Peter Tieleman (<http://moose.bio.ucalgary.ca>). No corrente estudo foram avaliadas e utilizadas membranas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)<sup>37</sup>, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)<sup>37</sup> e 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC)<sup>37,45</sup>. A manipulação da estrutura proteica, protonação e construção da região omissa foi efectuada no *Molecular Operating Environment* (MOE 2009.10)<sup>46</sup>, a construção de membranas e simulações de dinâmica molecular foram realizadas no GROMACS<sup>47-49</sup>. Nas fases iniciais do presente estudo foi também utilizado o *InflateGRO*<sup>50</sup> para a inserção da proteína em membranas e o *GridMAT-MD*<sup>51</sup> para o cálculo da área por lípido ( $A_L$ ) dos sistemas membranares. O programa de visualização molecular *VMD*<sup>52</sup> foi utilizado para permitir a inspecção visual das estruturas.

**3.2.2. Parâmetros das simulações.** Comum às simulações de equilibração e produção foi a aplicação de condições de fronteira periódica (PBC) e dos algoritmos PME<sup>20,21</sup> no

tratamento das interações electrostáticas a longa distância e LINCS<sup>17</sup> na restrição do comprimento das ligações (SETTLE<sup>53</sup> para as moléculas de água). Por forma a termostatar a temperatura de um modo uniforme em todo o sistema, no início de cada simulação foram efectuadas corridas de equilibração (NVT) nas quais foi utilizado o algoritmo *Velocity-rescale* (V-rescale)<sup>54</sup>, mantendo fixas as posições espaciais dos átomos proteicos. As corridas finais de equilibração e de produção decorreram a temperatura e pressão constante (NPT), variáveis controladas através da aplicação dos termostato de Nosé-Hoover<sup>55,56</sup> e baróstato de Parrinello-Rahman<sup>57,58</sup>. O raio de corte das interações de van der Waals e electrostáticas é idêntico (1,2 nm) e a compressibilidade do sistema encontra-se definido como  $4,5 \times 10^{-5}$  bar. Na presença de membranas, a equilibração da pressão é efectuada através da aplicação de pressão semi-isotrópica, permitindo a variação dos valores nos eixos XY de forma independente da registada no eixo dos Z.

**3.2.3. Construção dos sistemas membranares.** A partir das membranas iniciais, contendo 64 lípidos em cada camada, foram construídas membranas de 512 fosfolípidos (256 por camada) com recurso ao módulo *genconf* do GROMACS. Cada membrana (DMPC, DPPC e POPC) foi parametrizada de acordo com três campos de força distintos baseados nos estudos descritos por Berger *et al.*<sup>37</sup>, Kukol<sup>42</sup> e Poger *et al.*<sup>44,45</sup> e equilibrada através de uma corrida NVT de 100 picossegundos (ps) à temperatura de 313 K, 323 K e 303 K respectivamente. As temperaturas foram seleccionadas por forma a manter os lípidos na fase fluida. A fase final da equilibração foi efectuada através da aplicação de pressão semi-isotrópica durante 5 nanossegundos (ns). As propriedades finais do sistema foram avaliadas através da determinação de parâmetros como a  $A_L$ , volume por lípido ( $V_L$ ), fluidez das cadeias hidrofóbicas, espessura da membrana e densidades parciais do sistema. Através do método acima descrito, foi também construída uma membrana de POPC para o campo de forças CHARMM27. A parametrização deste lípido encontra-se disponível no campo de forças que integra as versões 4.5.x. do GROMACS.

**3.2.4. Inserção inicial da proteína na membrana.** A estrutura cristalográfica correctamente protonada foi inserida em membranas previamente equilibradas de acordo com o método descrito por Kandt *et al.*<sup>50</sup> e o sistema foi neutralizado através da adição de um número adequado de iões cloreto. Após as equilibrações iniciais de temperatura, foi

permitido o ajuste dos lípidos, do solvente e dos íons em torno da proteína através da restrição espacial dos átomos da mesma. De seguida foi realizada uma corrida de produção não restringida com a duração de 20 ns. A estabilidade da estrutura final foi avaliada visualmente e por intermédio do cálculo da energia total do sistema.

**3.2.5. Construção da sequência de ligação.** A estrutura secundária da sequência de ligação foi calculada com recurso a programas de predição estruturais como o NetSurfP<sup>59</sup>, APSSP2<sup>60</sup>, PROF<sup>61</sup> ou CFSSP<sup>62</sup>. Após a determinação da estrutura provável, esta foi construída no MOE 2009.10 com recurso ao módulo *Protein Builder*. A estrutura resultante foi protonada e equilibrada em solvente implícito durante 100 ps a 300 K no MOE 2009.10, restringindo a distância entre os terminais  $\text{NH}_3^+$  e  $\text{COO}^-$  de acordo com a distância presente na estrutura cristalográfica. A estrutura equilibrada foi então convertida para o formato utilizado pelo GROMACS, solvatada e neutralizada através da adição de um íon cloreto. A estabilidade da estrutura secundária foi testada por intermédio de 8 simulações, mantendo apenas constante a restrição na distância  $\text{NH}_3^+/\text{COO}^-$  por forma a permitir o livre movimento dos restantes resíduos. Durante o processo de equilibração de temperatura, foram introduzidas modificações pontuais em cada uma das simulações, para que cada uma das estruturas partisse de pontos diferentes no espaço físico. A temperatura foi controlada através do algoritmo *V-rescale*, com excepção da simulação 5 onde foi testado o termostato desenvolvido por Berendsen<sup>63</sup>. A temperatura de referência foi de 313 K, com excepção das simulações 1 e 3 onde foram testadas temperaturas de 323 K e 303 K, respectivamente. Na simulação 4 foi efectuado um aumento gradual da temperatura através da utilização do algoritmo *simulated annealing*<sup>64</sup>. A variação do tamanho do raio de corte das interacções electrostáticas e de van der Waals foi igualmente testada nas simulações 6, 7 e 8. Os parâmetros da simulação 2 não sofreram alteração, pelo que foram considerados como referência e termo de comparação. A corrida de produção subsequente ocorreu em condições idênticas para todas as simulações e utilizou o termostato de Nosé-Hoover para a manutenção da temperatura a 313 K e o baróstato de Parrinello-Rahman para o controle da pressão a 1 bar. As estruturas finais foram avaliadas através da análise da energia do sistema e do número de resíduos em posição proibida do gráfico de Ramachandran<sup>65</sup>.

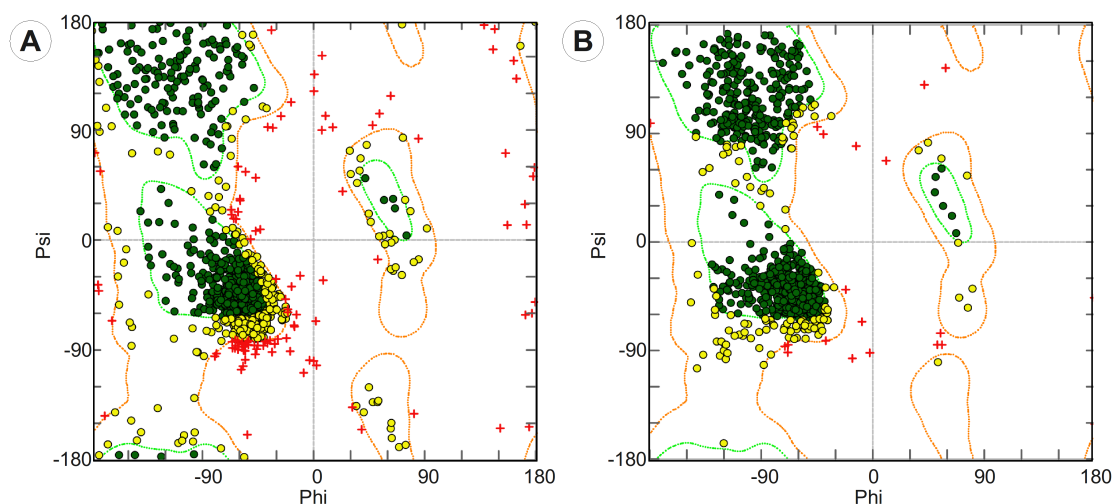
**3.2.6. Adição e equilibração da sequência na proteína.** As estruturas secundárias resultantes de quatro das simulações anteriores (2, 4, 5 e 7) foram inseridos na proteína, convertida para o formato GROMOS87 por forma a obter os ficheiros de topologia. Após a conversão foi inserida numa membrana de DMPC composta por 400 lípidos, solvatada e neutralizada electricamente pela adição de 26 iões cloreto. Por forma a equilibrar apenas a secção adicionada, a posição cartesiana dos restantes átomos foi restringida com excepção dos três aminoácidos imediatamente adjacentes. A equilibração da temperatura foi efectuada durante os primeiros 50 ps, seguida por uma corrida de produção com aplicação de pressão semi-isotrópica durante 20 ns. Os resultados foram avaliados através da observação da evolução das energias total e potencial do sistema e das interacções de Lennard-Jones a curta distância entre lípidos e proteína. Após uma avaliação visual da estrutura final, a simulação seleccionada foi inserida em membranas constituídas por diferentes lípidos com recurso ao módulo *g\_membed*<sup>66</sup>, disponível na versão 4.5.3. do GROMACS.

**3.2.7. Condições das corridas de produção.** As simulações de produção foram efectuadas na íntegra com recurso ao GROMACS, versões 4.5.3. e 4.5.4.. Após a equilibração de temperatura durante 100 ps em condições *NVT*, foi efectuada uma simulação *NPT* durante 3 ns com restrição espacial dos átomos da proteína, após a qual se realizou a simulação não-restringida mantendo as mesmas condições durante 100 ns. No final, foram avaliados todos os parâmetros referentes à estabilidade da estrutura proteica (energias, desvio quadrático médio – RMSD, raio de giração – GYR, flutuação quadrática média - RMSF, área acessível pelo solvente - SAS e pontes de hidrogénio - HB) e da membrana (energias,  $A_L$ ,  $V_L$ , parâmetros de ordem de deutério, fluidez das caudas dos lípidos e densidades parciais do sistema)

### 3.3. Resultados das simulações de Dinâmica Molecular

**3.3.1. Simulação inicial da proteína.** Um dos passos iniciais consistiu na realização de uma simulação computacional da proteína a partir dos dados cristalográficos, por forma a avaliar a estabilidade da estrutura *per si*. A protonação da sequência com recurso ao MOE 2009.10<sup>46</sup> forneceu a indicação de que os resíduos que compõem o DBS se encontram maioritariamente na sua forma neutra, à excepção do Glu871 (carboxilato) na parte

terminal do TMD10. O mesmo programa permitiu a identificação de 122 resíduos em zona proibida no gráfico de Ramachandran<sup>65</sup> (**Gráfico 4-A**), diminuindo para 23 (**Gráfico 4-B**) após as corridas de equilibrção (*NVT* de 100 ps e *NPT* de 10 ns), o que revela uma progressão dos resíduos para posições favoravelmente mais energéticas, tendo como consequência directa o aumento da estabilidade da estrutura.

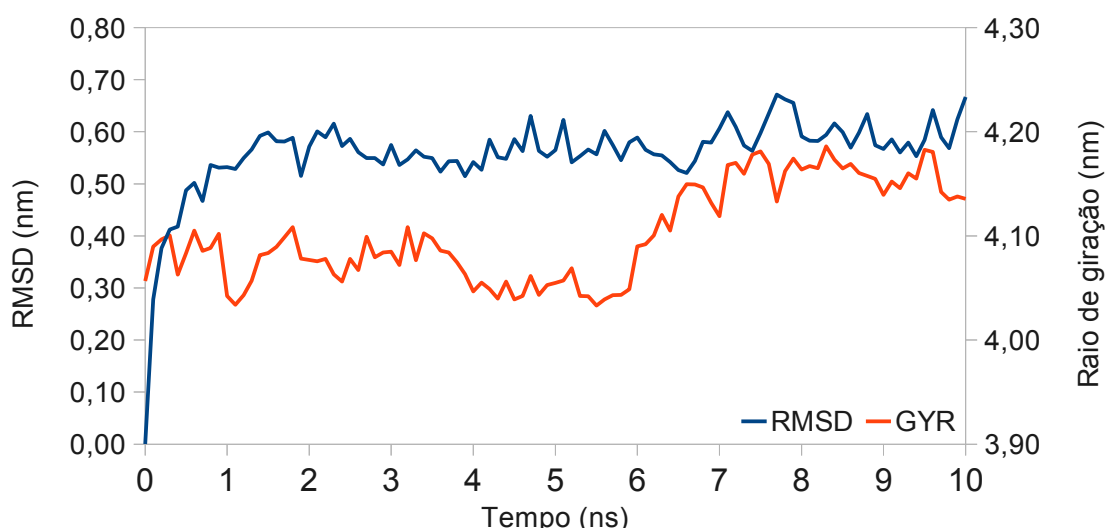


**Gráfico 4** - Gráfico de Ramachandran da estrutura inicial (A) e final (B) em água.

A estabilização estrutural é também observável através da evolução do RMSD, existindo um desvio considerável quando comparado com a estrutura inicial, adquirindo alguma estabilidade a partir dos 2 ns da simulação (**Gráfico 5**). O raio de giração, pelo contrário, não apresenta variações significativas (**Gráfico 5**), o que demonstra que as alterações principais não afectam directamente a estrutura secundária mas sim a organização tridimensional, nomeadamente em algumas hélices transmembranares ao nível do núcleo hidrofóbico da membrana e nas hélices laterais dos NBD. Estas alterações são acompanhadas por um afastamento progressivo entre as unidades, aumentando de aproximadamente 30 para 37,5 Å no final.

Estes dados estão de acordo com o esperado, tendo em conta a função da proteína em questão. Diversos estudos demonstraram que o processo de efluxo ocorre devido a alterações conformacionais induzidas pela ligação do substrato e do ATP<sup>67,68</sup>, pelo que uma elevada flexibilidade estrutural apresenta-se como um requisito essencial. Na presente simulação, foi observada uma organização dos resíduos hidrofóbicos presentes no interior do DBS, por forma a evitarem o ambiente polar criado pela entrada de moléculas de água

para o interior do mesmo. Não é observável a passagem de moléculas de água para o exterior devido à formação de uma barreira constituída maioritariamente pelas cadeias laterais de resíduos de fenilalanina (71, 332, 724, 728, 953 e 974) e tirosina (949). No entanto, este facto carece de validação posterior através da execução de simulações mais longas que permitam esclarecer o papel desta barreira no mecanismo de acção.



**Gráfico 5** - Desvio quadrático médio (RMSD) e raio de giração (GYR) da simulação da proteína cristalográfica em água.

Devido ao facto de vários estudos acentuarem a importância da sequência de ligação entre as cadeias cristalográficas iniciais<sup>69,70</sup> e da presença de uma membrana na qual a proteína esteja inserida<sup>6,71-73</sup>, a ausência de ambas pode explicar os resultados observados e as alterações estruturais ocorridas.

**3.3.2. Inserção da proteína em DMPC e posterior avaliação.** Pelo exposto no parágrafo anterior e por forma a avaliar o comportamento da proteína cristalográfica na presença de uma membrana, procedeu-se à construção e validação de três sistemas computacionais contendo membranas de DMPC com diferentes parametrizações para as moléculas lipídicas. As parametrizações foram obtidas a partir de estudos conduzidos por Berger *et al.*<sup>37</sup>, Kukol<sup>42</sup> e Poger *et al.*<sup>44,45</sup> e utilizadas por forma a avaliar o efeito dos diferentes parâmetros na estabilidade da estrutura do transportador (**Tabela 5**).

O ângulo normalmente formado entre os domínios transmembranares e o plano da membrana tem um valor de  $4^{\circ 74}$ , existindo um desvio para valores superiores a  $15^{\circ}$  no final das corridas de produção, de duração de 30 ns (**Figura 15**). A alteração registada no

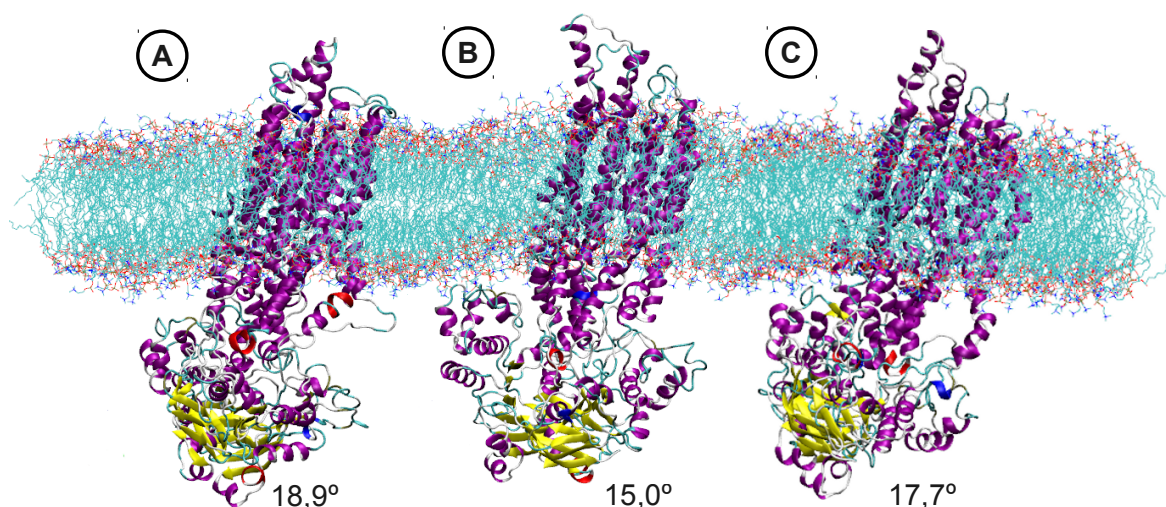


ângulo de inserção pode ser explicada pelas contribuições da espessura e fluidez da membrana e pela ausência da sequência de ligação.

**Tabela 5** – Comparação das propriedades no final das corridas de produção das diferentes membranas de 512 lípidos ( $A_L$ : área por lípido;  $V_L$ : volume por lípido).

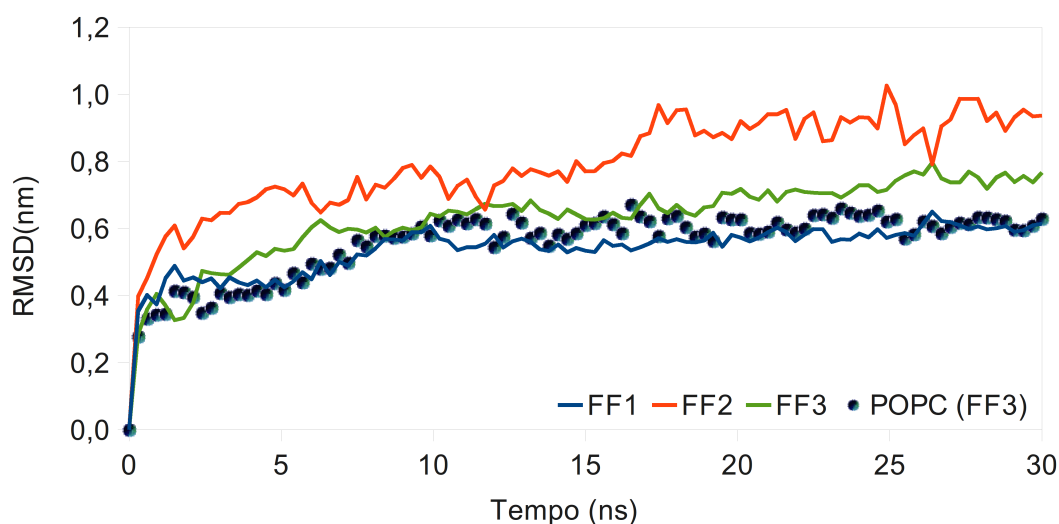
	Parâmetros	Berger (FF1)	Kukol (FF2)	Poger (FF3)	Experimental
DMPC	Densidade (kg.m <sup>3</sup> )	1020,23	989,52	1013,79	n.d.
	$A_L$ (nm <sup>2</sup> )	0,609	0,617	0,605	0,606 <sup>77</sup>
	$V_L$ (nm <sup>3</sup> )	1,056	0,000	1,068	1,101 <sup>77</sup>
	Espessura (nm)	3,48	3,55	3,52	3,53 <sup>77</sup>
DPPC	Densidade (kg.m <sup>3</sup> )	1009,19	977,24	995,15	n.d.
	$A_L$ (nm <sup>2</sup> )	0,610	0,620	0,607	0,631 <sup>75</sup>
	$V_L$ (nm <sup>3</sup> )	1,179	1,240	1,195	1,229 <sup>75</sup>
	Espessura (nm)	3,80	3,86	3,75	3,80 <sup>75</sup>
POPC	Densidade (kg.m <sup>3</sup> )	1022,54	993,89	1016,88	n.d.
	$A_L$ (nm <sup>2</sup> )	0,599	0,694	0,649	0,683 <sup>75</sup>
	$V_L$ (nm <sup>3</sup> )	1,197	1,246	1,207	1,223 <sup>76</sup>
	Espessura (nm)	3,93	3,49	3,72	3,70 <sup>75</sup>

No que concerne ao primeiro caso, o valor da espessura do núcleo hidrofóbico da P-gp é de  $3,18 \pm 0,12$  nm<sup>74</sup>. O mesmo parâmetro apresenta um valor médio de apenas  $2,85 \pm 0,06$  nm na membrana de DMPC, sendo esta diferença designada por *desfasamento hidrofóbico*<sup>78</sup> (hydrophobic mismatch).

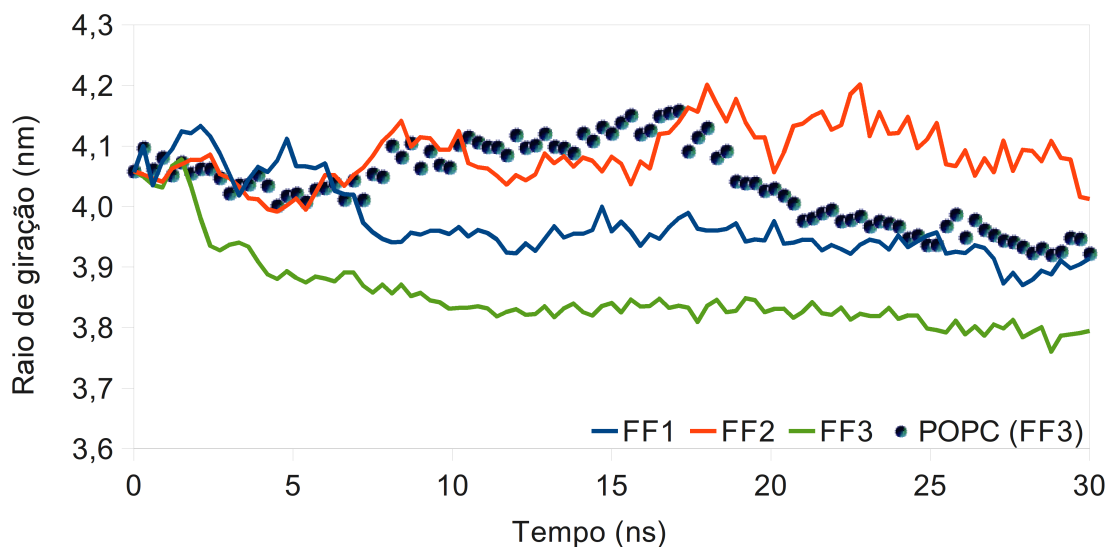


**Figura 15** - Representações finais das corridas de produção (30 ns) em DMPC e respectivo ângulo de inclinação da proteína (A - Berger *et al.*; B - Kukol; C - Poger *et al.*).

A discrepância de valores existente entre as zonas hidrofóbicas da P-gp e da bicamada provoca a inclinação da proteína para o interior mais hidrofóbico, o que cria uma alteração no empacotamento das hélices transmembranares e, conseqüentemente, provoca uma alteração na organização estrutural bem como na distância entre os NBD. Simulações adicionais com membranas de DPPC e POPC evidenciaram, por sua vez, uma espessura do núcleo hidrofóbico que ronda em média os  $3,19 \pm 0,04$  nm e  $3,27 \pm 0,03$  nm, respectivamente. Com a inserção da proteína em membranas constituídas por este tipo de lípidos não são discerníveis alterações significativas nos ângulos formados entre os TMD e o plano da membrana. No decurso destas simulações foi ainda observado que as moléculas de POPC com a parametrização descrita por Kukol originam uma membrana de espessura total (3,49 nm) e núcleo hidrofóbico (2,86 nm) bastante inferior aos resultados experimentais, invalidando deste modo a sua utilização em simulações posteriores. Após a inserção da proteína numa membrana de DMPC, o RMSD (**Gráfico 6**) e GYR (**Gráfico 7**) apresentam alterações em relação à simulação da proteína feita apenas em solução. A simulação inicial (**Gráfico 5**) apresenta uma variação mais rápida no RMSD, atingindo valores semelhantes ao registados por volta dos 2 ns. No sistema membranar, a variação inicial é semelhante mas o crescimento de intensidade diminui de um modo consistente a partir do primeiro nanossegundo, estabilizando a partir dos 10 ns (Berger *et al.* e Poger *et al.*) ou 18ns (Kukol) até final.



**Gráfico 6** - RMSD da corrida de produção (30 ns) com a proteína inserida numa membrana de DMPC nas diferentes parameterizações (FF1, Berger *et al.*; FF2, Kukol; FF3, Poger *et al.*). [•], resultado para o POPC com a parametrização FF3.



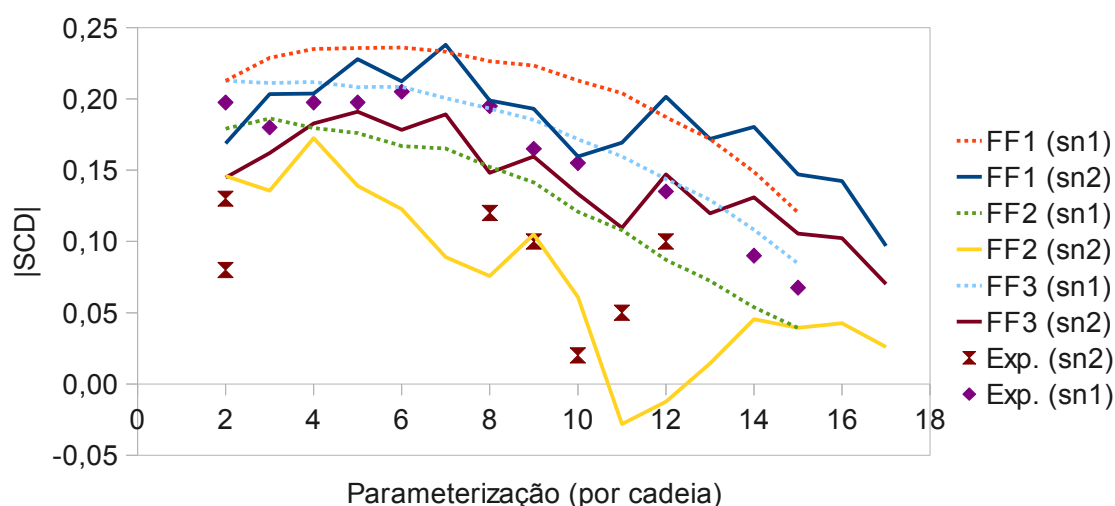
**Gráfico 7** - GYR da corrida de produção (30 ns) com a proteína inserida numa membrana de DMPC nas diferentes parametrizações (FF1, Berger *et al.*; FF2, Kukol; FF3, Poger *et al.*). [●], resultado para o POPC com a parametrização FF3.

Os dados sugerem que, após um momento inicial em que os lípidos se ajustam em redor da proteína, a membrana contribui de forma efectiva para a estabilização da estrutura secundária, informação cuja evolução do GYR parece corroborar (**Gráfico 7**), embora não seja suficiente para a total estabilização devido ao desfasamento hidrofóbico.

Com a substituição do DMPC por POPC, verificamos a existência de uma relação directa entre o aumento da espessura da membrana e a estabilização mais eficiente da estrutura, observável no RMSD e GYR dos gráficos anteriores. Se considerarmos que a composição das membranas das células eucariotas, que contém uma maior percentagem de lípidos insaturados em detrimento dos de cadeia saturada<sup>79</sup>, e tendo em conta as temperaturas de transição de fase gel-fluida do DPPC e POPC (315 K<sup>80</sup> e 270 K<sup>81</sup> respectivamente), o facto das simulações de membranas de POPC ocorrerem abaixo da temperatura corporal média (309 K) apresenta-se como uma vantagem adicional. Pelo contrário, a utilização de temperaturas superiores (323 K) nos sistemas membranares de DPPC podem introduzir alterações estruturais irreversíveis decorrentes da temperatura (desnaturação), facto pelo qual o POPC apresenta características mais adequadas para a sua utilização em simulações subsequentes.

A fluidez das cadeias hidrofóbicas, medida pela orientação relativa dos grupos metileno em relação à normal da membrana<sup>82</sup> (parâmetros de deutério), é outro dos parâmetros passíveis de análise. Os resultados demonstram que em todas as simulações as cadeias

alifáticas se encontram desordenadas (**Gráfico 8**), sendo claramente perceptível entre a cadeia de palmitoil (*sn1*) e oleoil (*sn2*) devido à presença da dupla ligação. As diferenças registadas na área ( $A_L$ ) e volume por lípido ( $V_L$ ) não são significativas, obtendo-se com a parametrização desenvolvida por Poger *et al.* um valor de  $0,709 \text{ nm}^2$  para o  $A_L$  e  $1,211 \text{ nm}^3$  para o  $V_L$ , bastante próximos dos valores experimentais.



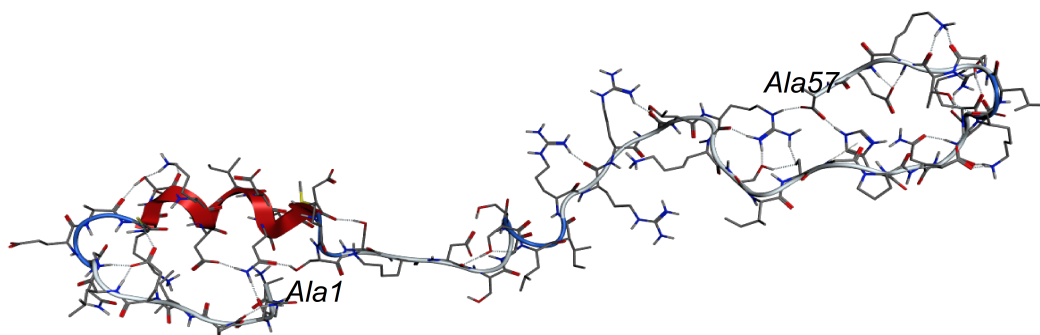
**Gráfico 8** - Perfis dos parâmetros de deutério, indicadores da organização das cadeias hidrofóbicas, acompanhados dos respectivos valores experimentais.

Após a análise das contribuições dos fosfolípidos, há que considerar de igual modo o efeito da ausência da sequência de ligação (segmento intermédio ausente na estrutura cristalográfica), devido ao carácter essencial que apresenta no transporte e estimulação pelos substratos<sup>69,70,72</sup>. A sua substituição por uma sequência de diferente tamanho ou cuja estrutura secundária tenha sido prevista não parece afectar a actividade. Contudo, a substituição por uma sequência rígida (uma hélice) impede a correcta expressão da proteína à superfície das células<sup>69</sup>, implicando também esta zona da molécula como importante no tráfego intracelular. Importa, por isso, avaliar quais as modificações que ocorrem a nível estrutural com a adição da sequência omissa, o que implica a sua construção e inserção na proteína cristalográfica.

**3.3.3. Construção e equilíbrio do segmento intermédio.** O segmento intermédio foi construído com recurso a programas de predição da estrutura secundária de proteínas. Os resultados obtidos através de vários testes é consistente e indica a existência de uma pequena hélice na porção inicial do segmento sendo o restante constituído por uma cadeia linear. Uma análise mais profunda da sequência disponibilizada pela

PredictProtein.org<sup>83</sup> (através do site [www.predictprotein.org](http://www.predictprotein.org)) revela que 89,47% forma uma espiral ('coil') desorganizada com a probabilidade de 10.53% para a formação de outras estruturas (hélices alfa ou folhas beta). 87,72% dos segmentos encontram-se expostos, ocorrendo também a identificação de sequências favoráveis a interações proteína-proteína (Met-Leu-Asp, Arg-Ser e Lys-Ser-Ile). Um facto interessante decorre da previsão da existência de uma sequência de ligação a nucleótidos, composta pelos aminoácidos Arg-Ser-Thr-Arg-Lys na zona mediana do segmento intermédio.

A partir da estrutura construída no MOE 2009.10, uma equilibração prévia em solvente implícito revela que o comprimento da hélice inicialmente prevista diminui, abrangendo apenas os aminoácidos 13-22, privilegiando a existência de estruturas lineares em detrimento de outras hélices ou folhas beta. Estes resultados são suportados pelo estudo de Aller *et al.*, pois devido à elevada mobilidade deste segmento não foi possível a sua determinação cristalográfica<sup>84</sup>.

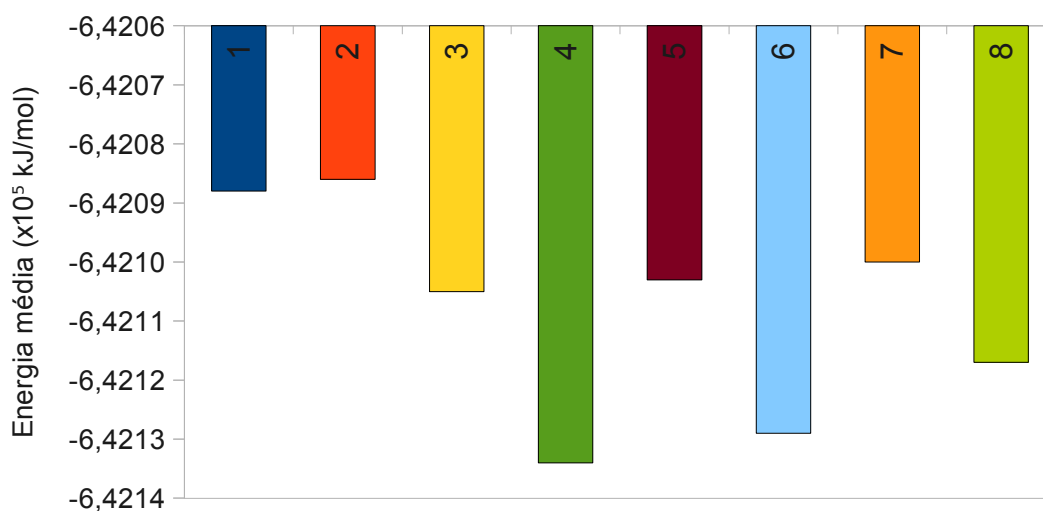


**Figura 16** - Estrutura secundária inicial do segmento intermédio, indicando os aminoácidos inicial e terminal.

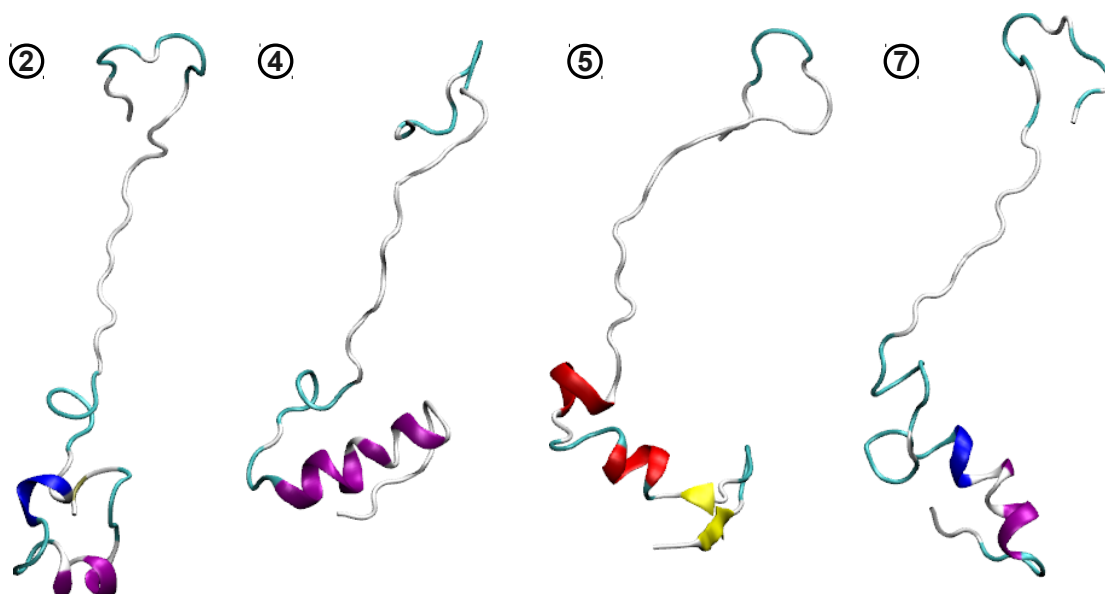
A análise da energia total dos sistemas contendo apenas o segmento intermédio revela que as energias mais baixas foram obtidas nas simulações 4, 6 e 8 (**Gráfico 9**).

A observação visual da evolução das estruturas confirmou que a hélice prevista tende a manter-se relativamente estável, ocorrendo também em todas as simulações a formação de uma volta (*loop*) na extremidade superior do segmento (**Figura 17**). Em relação à estrutura secundária, o gráfico de Ramachandran indica a ausência de *outliers* nas simulações 4 e 8 e um número reduzido nas simulações 2, 5 e 6. Contudo, o facto do segmento não se encontrar inserido na estrutura final pode conduzir à obtenção de conformações erróneas devido à não-existência de interações proteína-proteína com a restante estrutura ou proteína-lípido entre a porção superior do segmento, situada junto

da interface inferior da membrana.



**Gráfico 9** - Energias médias das corridas de equilíbrio do segmento intermédio.

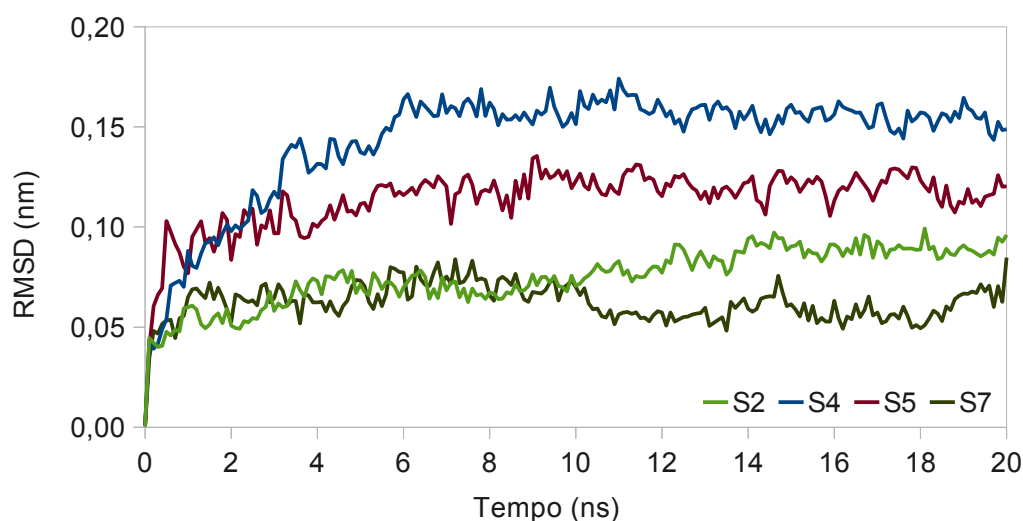


**Figura 17** - Estruturas secundárias após a corrida de equilíbrio das simulações 2, 4, 5 e 7.

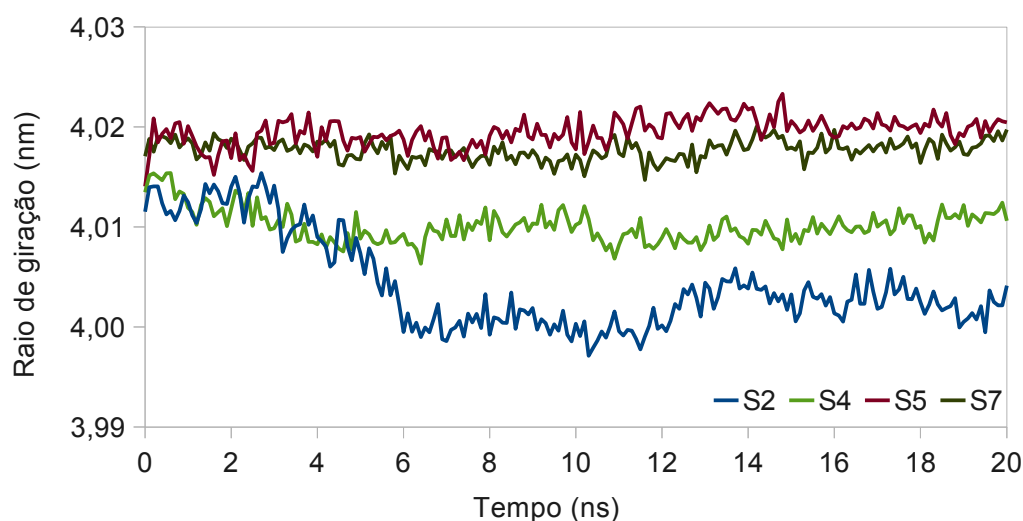
A influência da restante estrutura proteica e da membrana lipídica foi sujeita a investigação através da inserção dos segmentos resultantes das simulações 2, 4, 5 e 7 na P-gp para posterior equilíbrio na presença de uma membrana de DMPC.

Os segmentos definidos anteriormente foram introduzidos na estrutura cristalográfica original e a estrutura resultante foi inserida na membrana com recurso ao *InflateGRO*<sup>50</sup>. Os resultados da equilíbrio encontram-se representados nos **Gráficos 10** e **11**. A análise visual dos segmentos permitiu identificar a posição do *loop* superior numa zona bem definida, formando uma ansa posicionada à entrada da cavidade interna e próximo da

interface inferior da membrana (meio intracelular), restringindo o acesso ao DBS a partir do citoplasma e invalidando deste modo o modelo do poro membranar.



**Gráfico 10** - Evolução do RMSD dos segmentos.



**Gráfico 11** - Evolução do GYR dos segmentos.

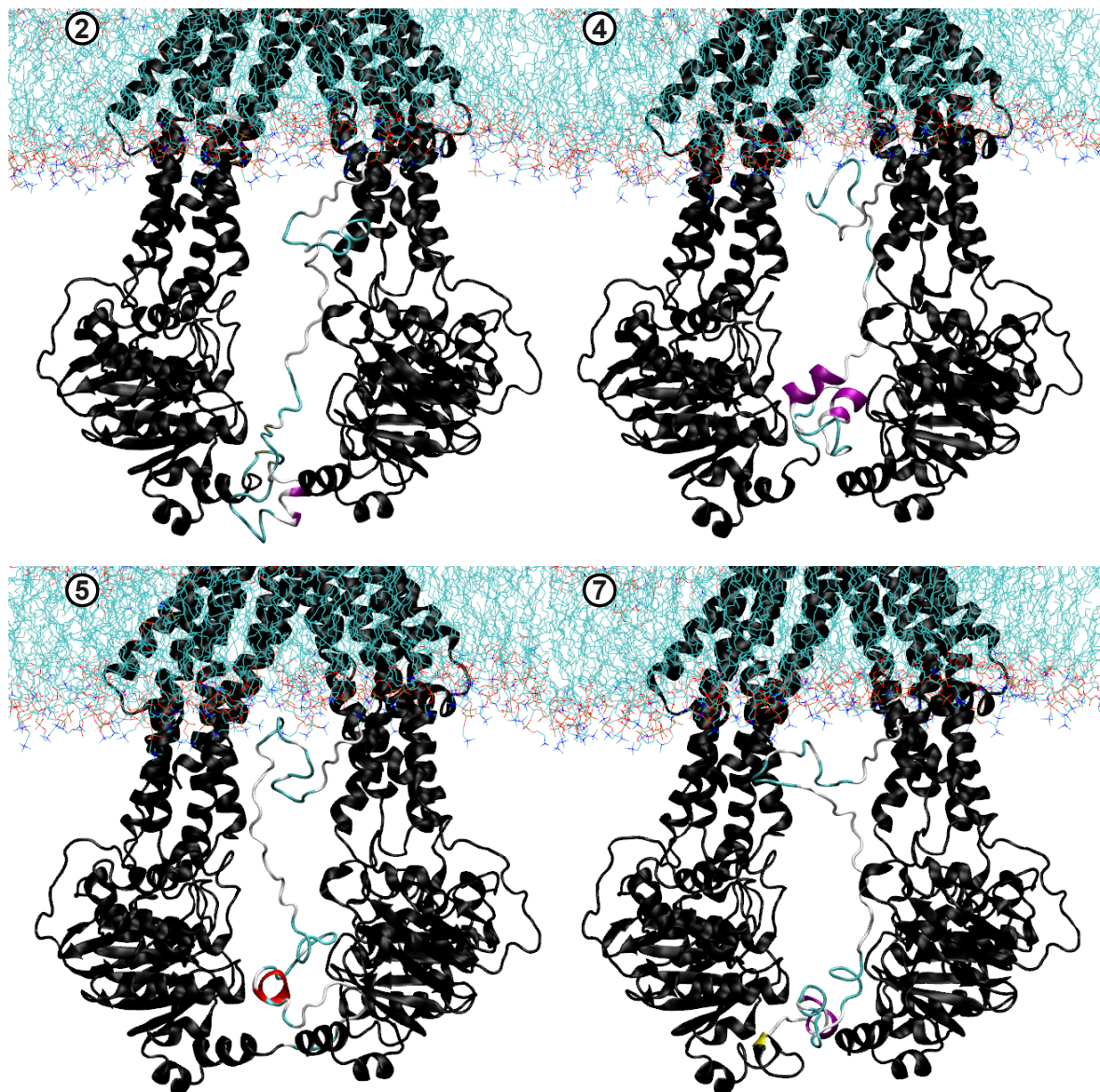
A hélice do segmento inferior tende a mostrar uma maior heterogeneidade, formando duas hélices pequenas (**Figura 18-4**) ou uma mais curta com um segmento arqueado que interage com o NBD oposto (**Figura 18-5**).

Os dados obtidos através destas simulações evidenciaram a elevada mobilidade descrita para o segmento intermédio. No entanto, foi possível obter uma organização secundária provável para a avaliação da sua importância na estabilidade estrutural da P-gp.

**3.3.4. Avaliação e equilibração da estrutura total.** A posterior inserção da estrutura total em diferentes membranas (DMPC, DPPC e POPC) e em diferentes solventes (água e



tetracloreto de carbono) revelou que o transportador tende a manter a integridade da sua estrutura secundária relativamente inalterada, existindo no entanto alterações específicas e pontuais relacionadas intimamente com as condições das diversas simulações.

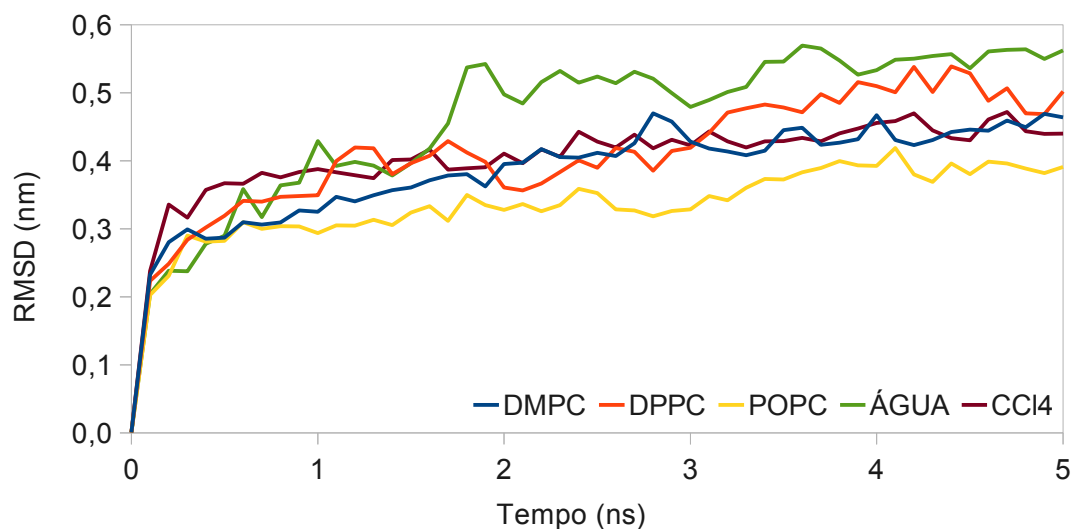


**Figura 18** - Estrutura secundária final após a corrida de equilibração do segmento intermédio.

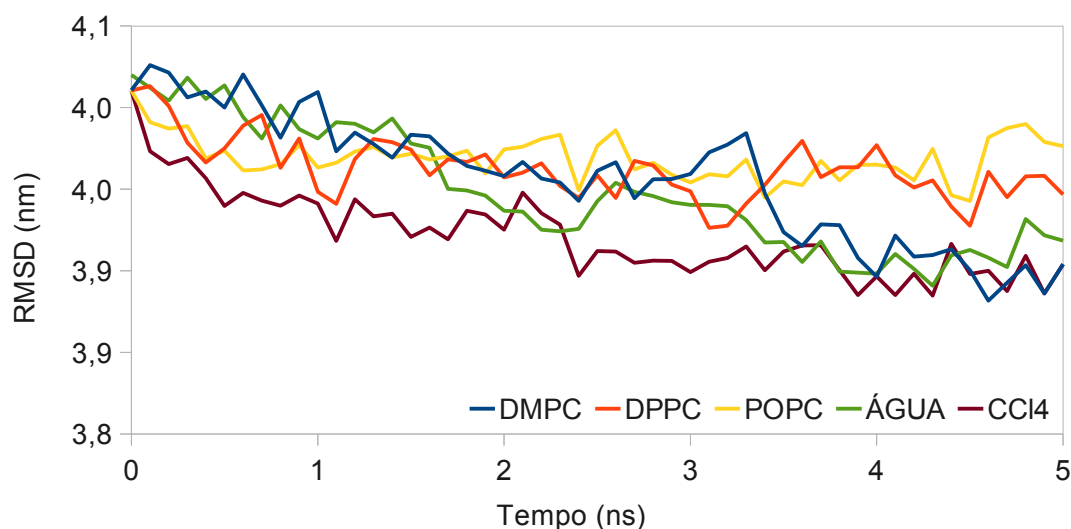
Em ambiente polar, e não obstante do RMSD alcançar valores semelhantes aos obtidos anteriormente (**Gráfico 12**), é possível verificar a existência de comportamentos distintos no GYR (**Gráfico 13**) correspondendo a uma ligeira desorganização nos NBD e pequeno decréscimo na distância entre ambos, em contraste com a maior desorganização dos TMD e expansão lateral da proteína registada em tetracloreto de carbono. Este último resultado não era expectável tendo em conta o ambiente hidrofóbico em que os TMD se



encontram, mas demonstra a importância da presença da membrana e da tensão que exerce na estrutura, contribuindo para a integridade aquando das alterações conformacionais.



**Gráfico 12** - Desvio quadrático médio das simulações contendo a proteína total, destinadas a avaliar a influência do segmento intermédio.



**Gráfico 13** - Raio de giração das simulações contendo a proteína total, destinadas a avaliar a influência do segmento intermédio.

Pode também indiciar uma elevada mobilidade das hélices, pois não obstante do permanente contacto com a membrana, estudos sugerem a possibilidade destas rodarem sobre o seu eixo como forma a alternar a afinidade do DBS<sup>67</sup> entre estados de baixa e elevada afinidade<sup>85</sup>. A comparação entre estes resultados sugere que as moléculas de água existentes no interior da cavidade interna da proteína podem, em conjunto com os lípidos da membrana, ser determinantes para a estabilização da estrutura secundária.

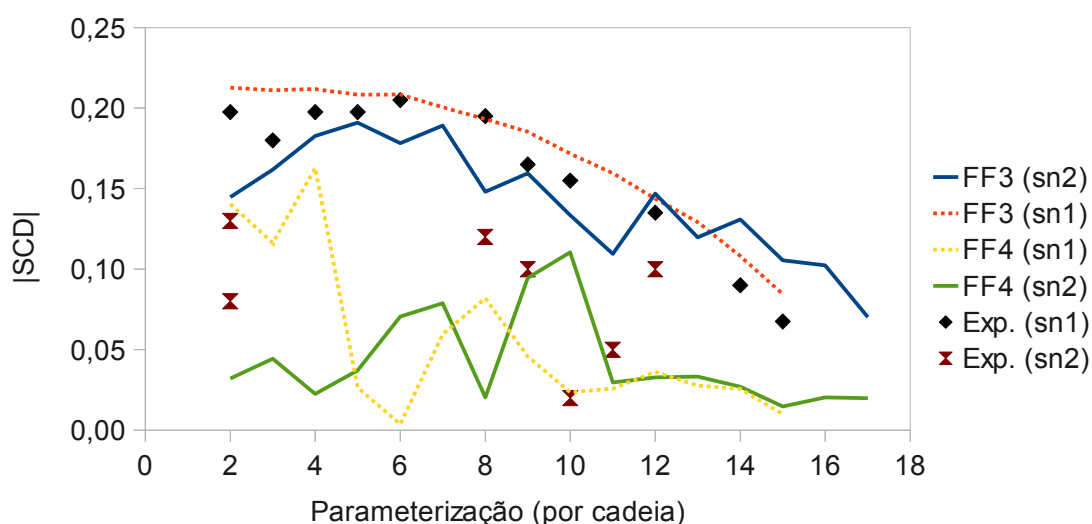
A inserção da proteína em membranas de DMPC, DPPC e POPC forneceram resultados semelhantes aos anteriores, com o campo de forças desenvolvido por Poger *et al.* a demonstrar melhores resultados na variação do RMSD (**Gráfico 12**) e raio de giração (**Gráfico 13**), com valores inferiores aos restantes. Similarmente, as diferenças registadas podem ser explicadas pelo maior desfasamento hidrofóbico existente na membrana de DMPC e na temperatura mais elevada utilizada pelo DPPC. É observável um incremento de 5,16% espessura da membrana de DMPC o que provoca uma curvatura da membrana com consequente alteração da posição do NBD2. Já no DPPC, o aumento da espessura chega aos 8,17%, sendo observáveis alterações mais significativas em ambos os NBD devido à contracção lateral na estrutura proteica. A diferença reside no facto de, na presença da sequência intermédia, o desfasamento hidrofóbico ser integralmente compensado pela expansão da membrana no eixo do Z (normal à bicamada), não sendo observada qualquer alteração no ângulo de inserção da proteína. A interpretação dos dados recolhidos elucida as funções do segmento intermédio e da membrana na estrutura e função da P-gp. A existência deste segmento intermédio permite uma estabilização mais eficaz da porção citosólica da P-gp, provavelmente por intermédio da formação de pontes de hidrogénio ou interacções dipolo-dipolo entre resíduos de cargas opostas. Por sua vez, a estabilidade conformacional das hélices transmembranares encontra-se directamente relacionada com a existência de uma membrana e a composição na qual se encontra inserida.

No decorrer da avaliação das diferentes parametrizações, alguns resultados sugeriram a utilização de um campo de forças diferente ao GROMOS por forma a avaliar a influência do próprio campo na qualidade da simulação. Pelo facto do CHARMM possuir parametrização base para o POPC, foi criado um sistema a partir do campo CHARMM27 (FF4), disponível a partir da versão 4.5.x. do GROMACS. A **Tabela 6** resume as propriedades da membrana de POPC com a parametrização CHARMM27.

**Tabela 6** – Propriedades finais da membrana lipídica com a parametrização CHARMM27 (FF4).

Parâmetros	Densidade (kg.m <sup>3</sup> )	A <sub>L</sub> (nm <sup>2</sup> )	V <sub>L</sub> (nm <sup>3</sup> )	Espessura (nm)
POPC	1021,41	0,729	847,76	3,33
Experimental	n.d.	0,683 <sup>38</sup>	1,223 <sup>39</sup>	3,70 <sup>38</sup>

Os valores obtidos para as propriedades da membrana com este novo campo de forças possuem desvios consideráveis em relação aos valores experimentais (**Tabela 6**). Também nos parâmetros de deutério para as cadeia de oleoiló (*sn2*) e palmitoiló (*sn1*) apresentam um perfil bastante distinto, mesmo quando comparadas com os campos de forças utilizados no GROMOS96 (**Gráfico 14**)



**Gráfico 14** - Perfis dos parâmetros de deutério, indicadores da organização das cadeias hidrofóbicas, acompanhados dos respectivos valores experimentais.

A diferença dos perfis de deutério do campo FF4 em relação ao outro campo e aos valores experimentais pode ser explicada pelo facto do campo de forças CHARMM27 utilizar co-senos simples na parametrização dos ângulos diedros<sup>86</sup>, através da equação

$$\phi_d = k_n [1 + \cos(n\phi - \delta)] \quad (6)$$

onde  $k_n$  representa a constante de força do ângulo diedro,  $n$  a multiplicidade da função,  $\phi$  o valor do ângulo diedro e  $\delta$  representa a mudança de fase. Foi demonstrado que a aplicação desta forma não reproduz correctamente o comportamento das caudas hidrofóbicas dos fosfolípidos. Outros campos de forças como o GROMOS96<sup>32</sup> ou o AMBER99<sup>87</sup> presentes no GROMACS utilizam uma série de Fourier em co-senos designada por *função de Ryckaert-Bellemans*<sup>16</sup>, através da equação

$$\phi_d = \sum_{\phi=0}^{\phi \leq 5} k_n \cos^{\phi}(\psi) \quad (7)$$

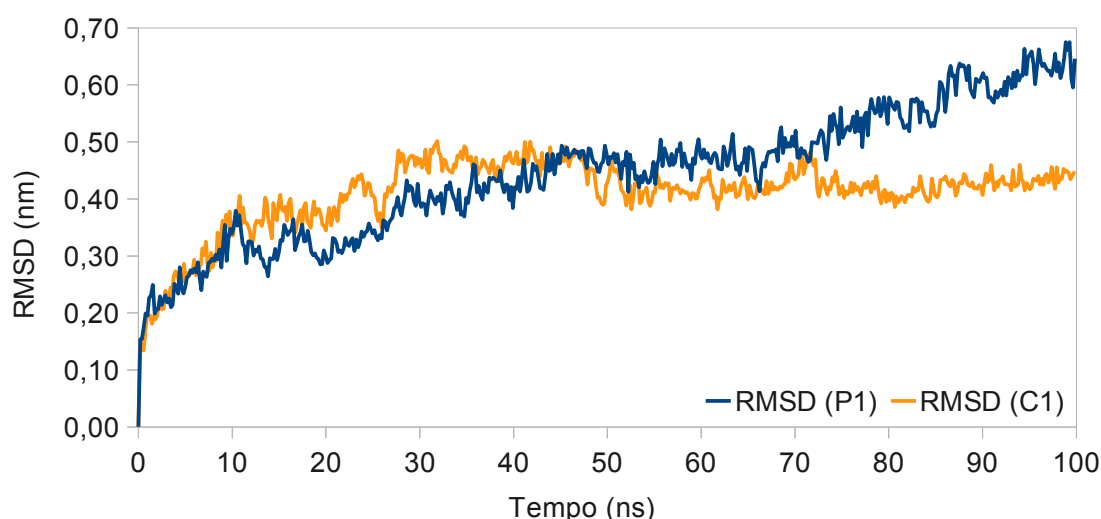
em que  $\psi$  se relaciona com  $\phi$  através da expressão  $\psi = \phi - 180^\circ$  e que permite a obtenção de resultados mais próximos dos parâmetros experimentais.

Os resultados confirmam o campo de forças GROMOS96 em conjunto com a

parametrização desenvolvida por Poger *et al.* como os mais adequados para executar uma corrida de produção com este transportador. No entanto, por forma a avaliar a influência do campo de forças na qualidade da simulação da estrutura proteica, uma simulação de maior duração foi igualmente realizada com o campo de forças CHARMM27.

**3.3.5. Análise das corridas de produção.** Foram efectuadas duas simulações, utilizando os campos de forças GROMOS96 em conjunto com a parametrização de Poger *et al.* e o CHARMM27, adiante designadas como simulações P1 e C1. Em ambas as simulações, a proteína foi inserida numa membrana de POPC previamente equilibrada, solvatada e neutralizada electricamente, sendo efectuado posteriormente um ciclo de minimização de energia (*EM*) e equilibração a *NVT* de 100 ps. Por forma a permitir a equilibração das moléculas de solvente e dos lípidos em redor da proteína, foi efectuada em seguida uma corrida *NPT* de 5 nanossegundos na qual os átomos da estrutura proteica permaneceram restringidos às posições iniciais. As primeiras corridas de produção realizaram-se como uma extensão das corridas *NPT* de equilibração, removendo a restrição espacial e durante um intervalo de tempo considerado suficiente para a obtenção de dados que permitissem a validação da estabilidade estrutural num intervalo de tempo mais alargado (a duração máxima de cada corrida de produção foi estabelecida como 100 ns).

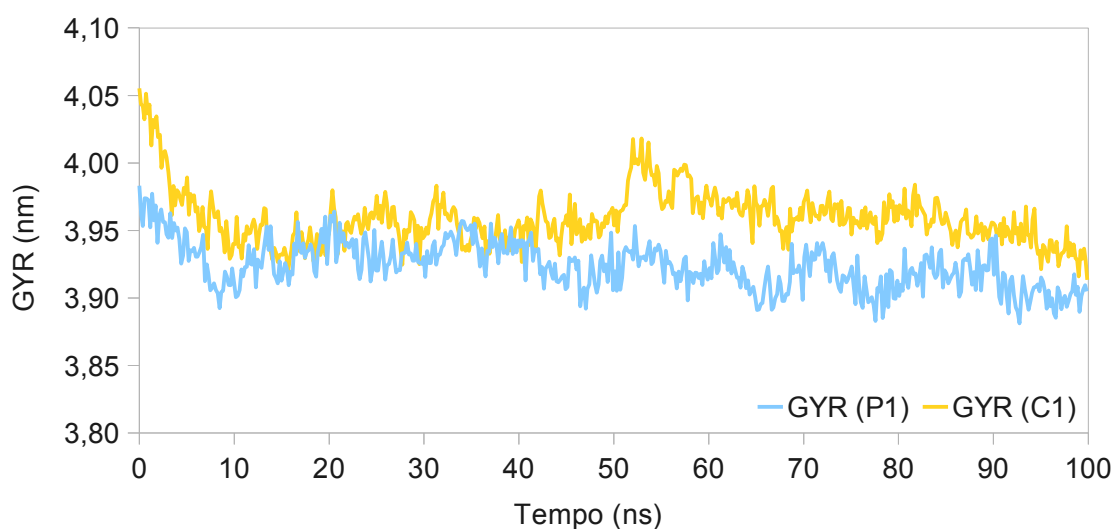
A análise do RMSD (**Gráfico 15**) revela que ambas as simulações apresentam uma variação inicial semelhante, sendo identificáveis duas zonas de crescimento distintas.



**Gráfico 15** - RMSD das simulações P1 e C1.

A primeira ocorre nos primeiros picossegundos da simulação e corresponde ao primeiro ajuste das cadeias laterais após a remoção da restrição na posição dos átomos, enquanto

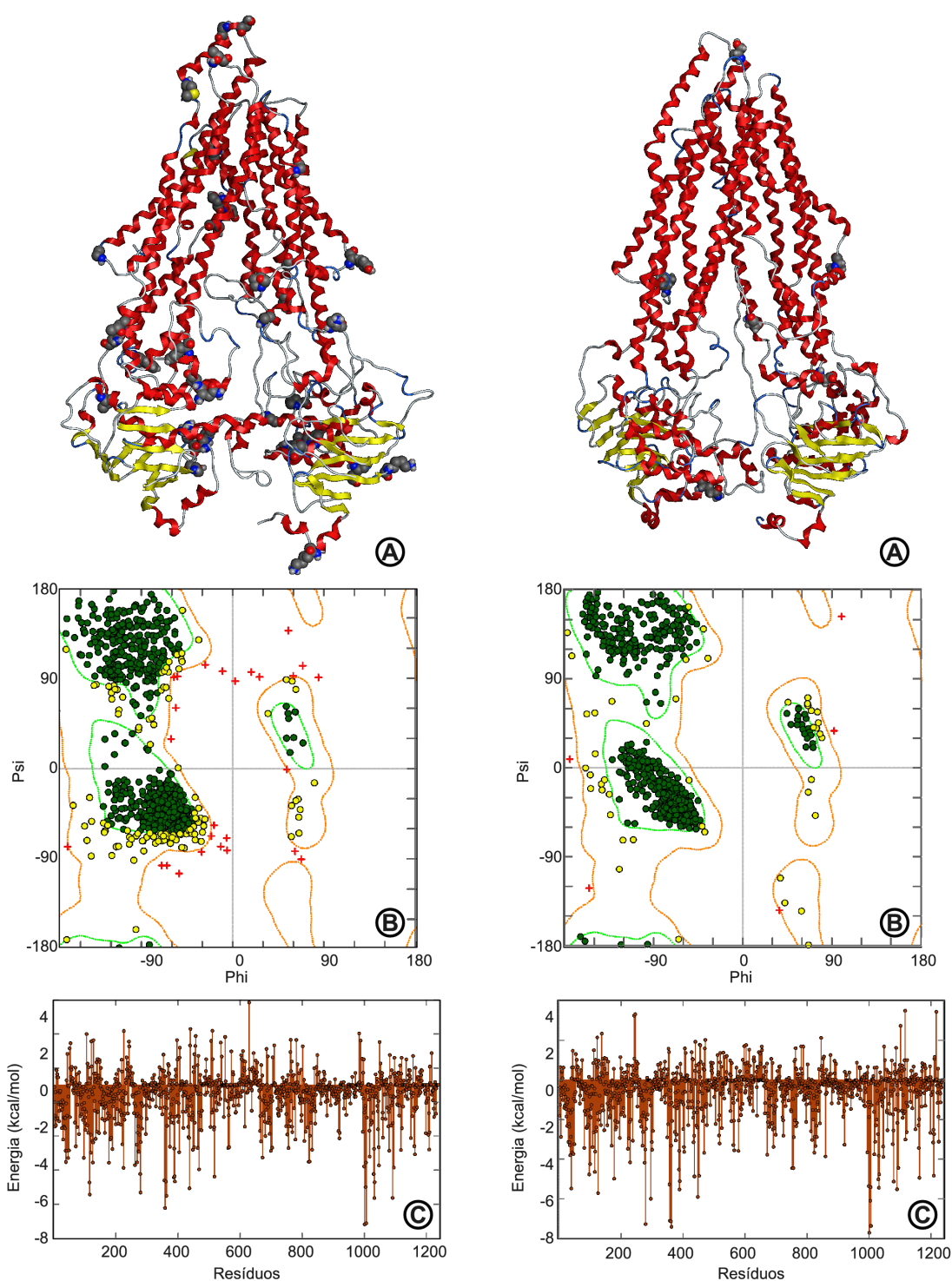
que a segunda ocorre durante os 10 ns iniciais, com um ajuste das cadeias e correspondente estrutura secundária à tensão exercida pela membrana. A partir dos 70 ns, a simulação P1 apresenta um maior índice de variação enquanto que a simulação C1 permanece relativamente estável, implicando que o campo de forças utilizado na C1 consegue estabilizar de um modo mais eficiente a estrutura secundária da proteína. A evolução do GYR (**Gráfico 16**) não apresenta, no entanto, diferenças significativas entre ambas as simulações, sendo os valores finais obtidos nos 10 ns iniciais.



**Gráfico 16** - GYR das simulações P1 e C1.

A análise dos gráficos anteriores revela a importância da escolha correcta do campo de forças a utilizar. O comportamento evidenciado pela simulação P1 deriva da baixa resolução da estrutura cristalográfica utilizada (3,8 Å), sendo por isso necessário um maior refinamento da estrutura ou um ciclo de equilibração mais longo. A observação das estruturas finais (**Figura 19-A**), do número de resíduos em zona proibida (**Figura 19-B**) e das energias de contacto finais (**Figura 19-C**) demonstra que o campo FF4, utilizado na simulação C1, se encontra parametrizado de um modo mais eficiente para permitir a melhor estabilização da estrutura secundária da proteína, embora não se revele tão adequado para a simulação de membranas (como demonstrado anteriormente).

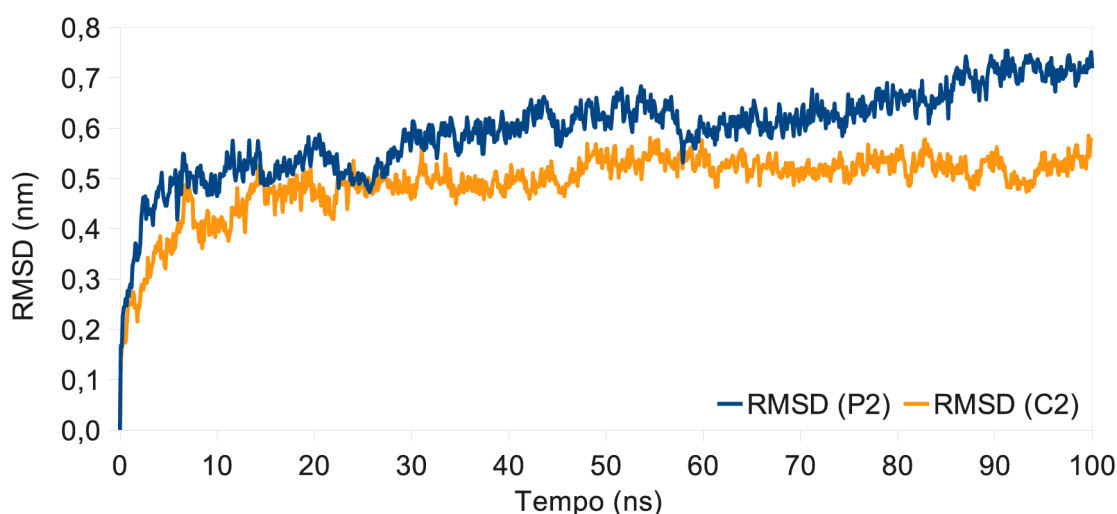
Por forma a determinar com maior exactidão a influência da resolução cristalográfica nas simulações, foi desenvolvido um novo protocolo de equilibração que consiste na progressiva diminuição da restrição das posições espaciais dos átomos da proteína através de simulações sucessivas de 500 ps em condições *NPT*.



**Figura 19** - Estruturas finais (A), resíduos em zona proibida no gráfico de Ramachandran final (B) e energias de contacto finais (C) para as simulações P1 (esquerda) e C1 (direita).

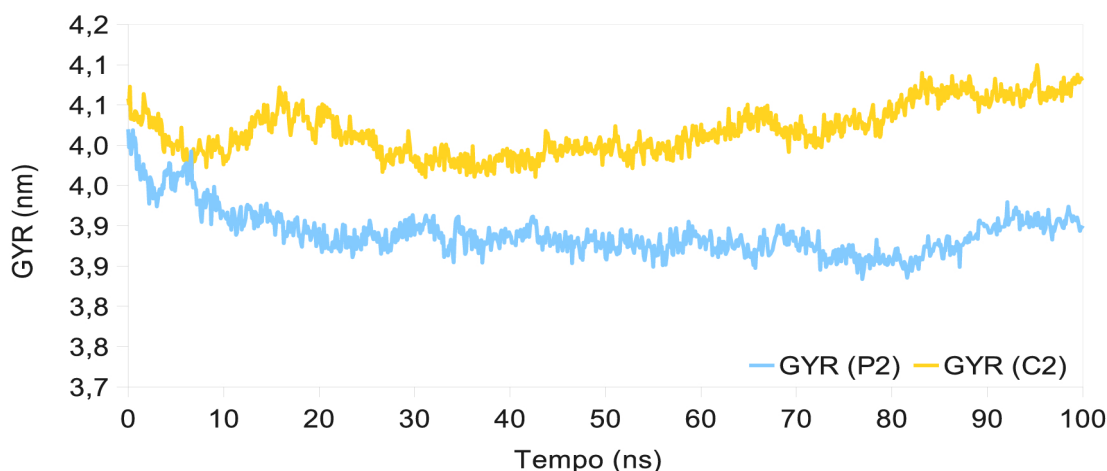
O protocolo inicia-se através da aplicação da restrição apenas na cadeia principal (*mainchain*), permitindo a equilibração da cadeia lateral, seguindo-se a restrição apenas da sequência principal (*backbone* - átomos de carbono e azoto) e terminando com a

restrição dos carbonos  $\alpha$  (*c-alpha*) antes da simulação não restringida. As simulações anteriores foram então repetidas de acordo com este método, designando-se por simulações P2 e C2). Apesar dos valores obtidos para o RMSD serem semelhantes ao das simulações P1 e C1, a estabilização da estrutura adquire maior significado nos nanossegundos iniciais, ocorrendo no restante tempo um aumento progressivo mas menos significativo quando comparado com as simulações em cujo protocolo não foi aplicado (**Gráfico 17**).



**Gráfico 17** - RMSD para as simulações P2 e C2.

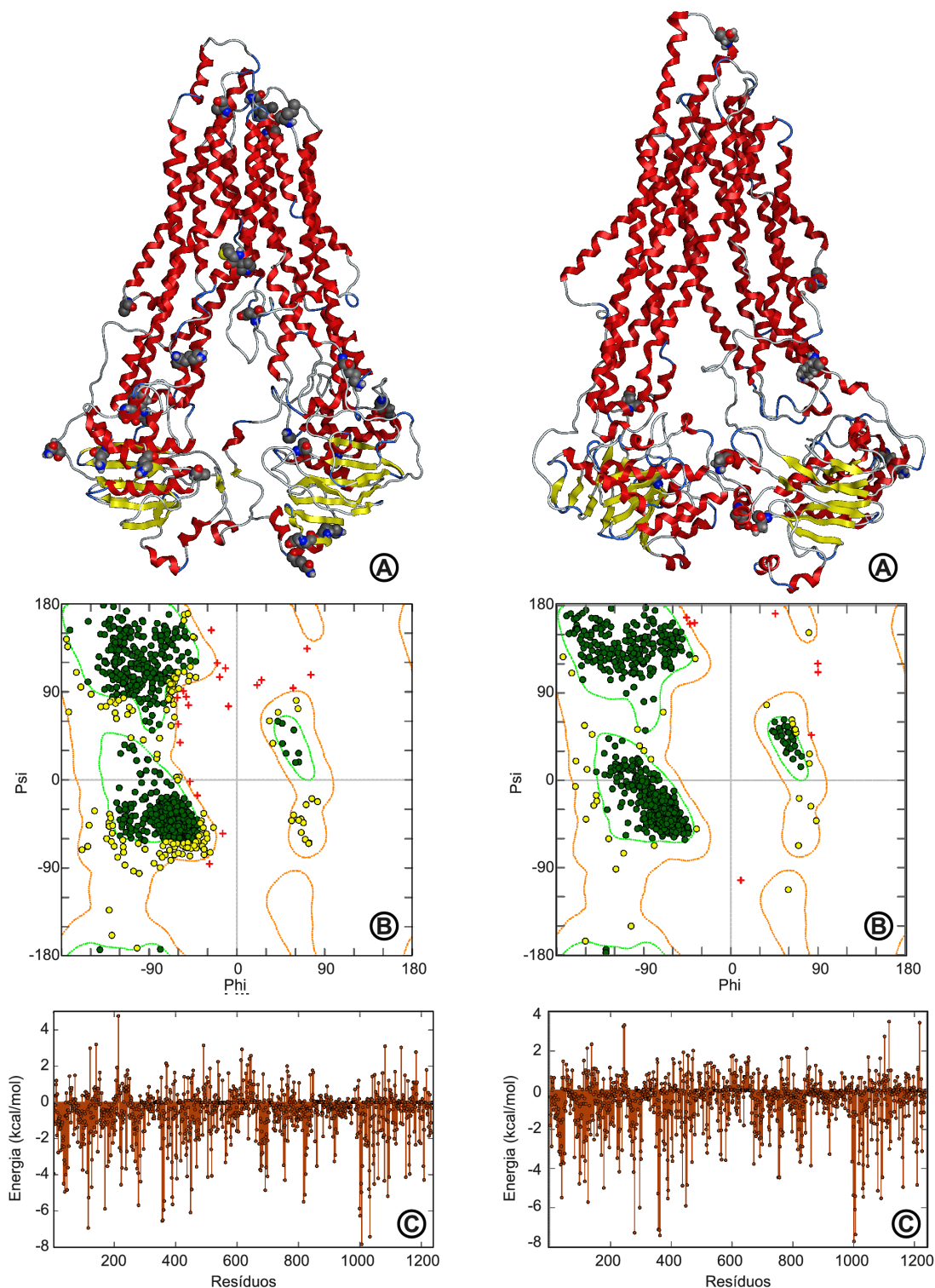
No entanto, a observação visual de ambas as estruturas finais revelam ter ocorrido uma menor distorção na resultante da simulação P2. A amostragem da estrutura P2 a diversos tempos (**Gráfico 18**) revela que a estrutura passou por estados de profunda alteração do seu arranjo tridimensional.



**Gráfico 18** - GYR para as simulações P2 e C2.



O número de resíduos em zonas proibidas do gráfico de Ramachandran permanece mais reduzido na simulação C2 (apenas 4 resíduos), sendo o número de resíduos *outlier* da P2 comparável aos registados na P1 (**Figura 20**).

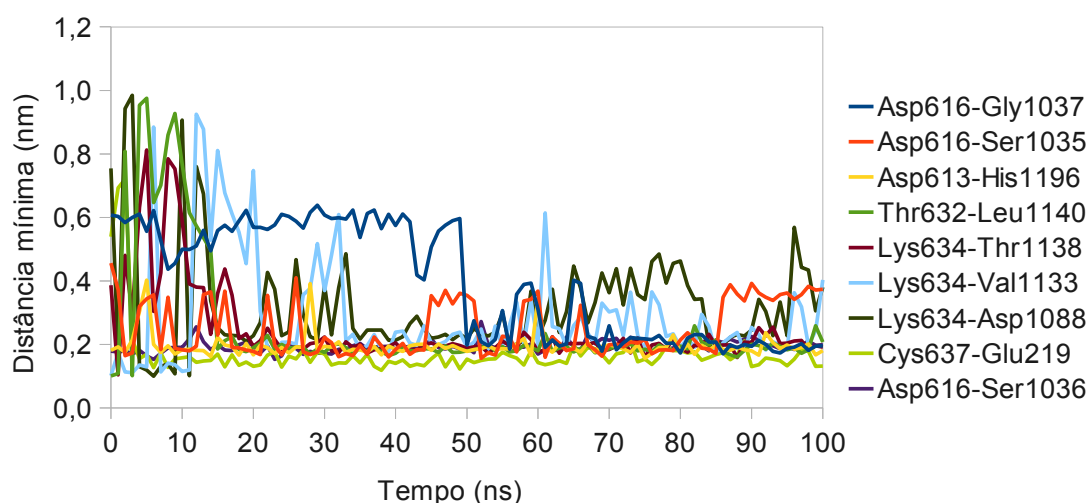


**Figura 20** - Estruturas finais (A), resíduos em zona proibida do gráfico de Ramachandran final (B) e energias de contacto finais (C) para as simulações P2 (esquerda) e C2 (direita).



As alterações observadas no NBD2 na simulação C2, pelo contrário, evidenciam a existência de alterações estruturais que culminaram com uma maior distorção na zona do NBD2. Considerando todos os dados anteriores, e tendo em mente os estudos que implicam de forma activa o segmento intermédio nos processos de transporte celular e mecanismo de acção, é imperativo perceber de que modo ocorre a estabilização estrutural dos domínios de ligação aos nucleótidos.

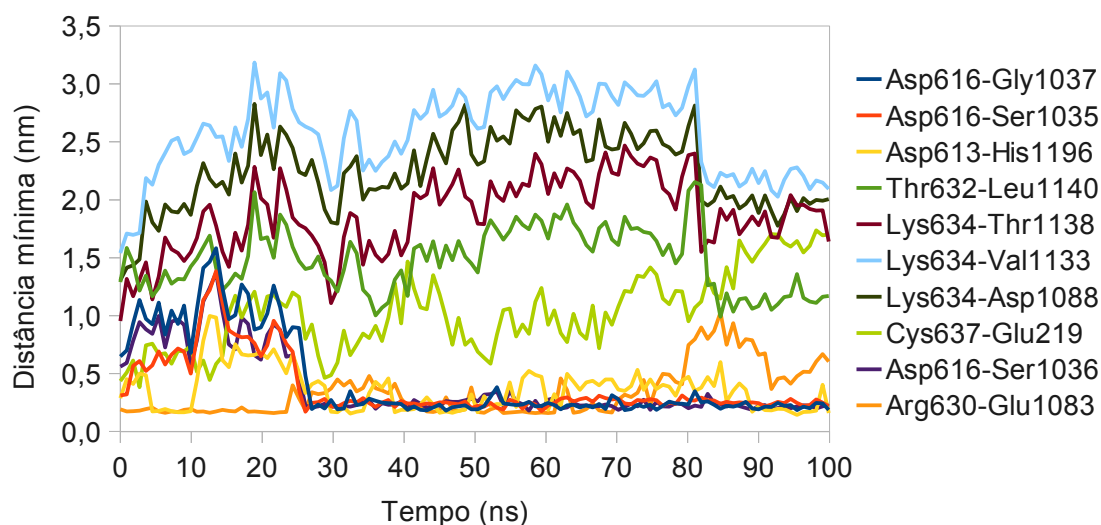
Uma análise mais cuidada da evolução da simulação P2 permitiu a identificação de duas superfícies de contacto entre o segmento ("linker") e o NBD2. A primeira, designada de CS1, situa-se junto do motivo *Walker-A*, na zona de acção do *Loop-A* que delimita o local de ligação do ATP. Esta superfície é formada pelos aminoácidos Asn613/Asp616 do segmento e Ser1035/Gly1037 do NBD2, envolvendo frequentemente o aminoácido His1196. A segunda foi designada de CS2 e encontra-se localizada na extremidade oposta, sendo constituída pela sequência Arg628/Lys634 do segmento e pelas sequências de aminoácidos Leu1140-Gly1143, Glu1165-Ser1168 e Leu1170-Glu1175, apesar de serem registados contactos também com os aminoácidos Glu1083 e Glu1138. Comum a todas as quatro simulações é a existência de um ponto de contacto localizado junto da interface membrana (Cys637/Glu219). Na simulação P2 (**Gráfico 19**) ocorre a formação de pontes de hidrogénio estáveis em ambas as superfícies, sendo ainda registados contactos adicionais entre os resíduos Asp616/Ser1035 (CS1), Lys634/Asp1088 e Lys634/Val1133 (CS2), pelo que se verifica uma distorção da estrutura bastante menor quando comparada com a estrutura resultante da simulação C2.



**Gráfico 19** - Variação da distância mínima entre os aminoácidos envolvidos na formação de pontes de hidrogénio 'linker'/NBD, na simulação P2.

Imagens detalhadas que ilustram as pontes de hidrogénio formadas em ambas as superfícies de contacto podem ser encontradas na secção II-2-D do *Anexo II*.

Na simulação C2 existe a formação de pontes de hidrogénio entre os resíduos Asp616/Ser1035 e a tríade Asp613/Arg628/Glu1165, o que corresponde à primeira superfície. Na zona de contacto CS2 não é discernível qualquer ponte de hidrogénio entre resíduos (**Gráfico 20**), embora seja registado um contacto bastante estável entre as cadeias laterais dos aminoácidos Arg630/Glu1083. As imagens das pontes de hidrogénio formadas podem ser encontradas na secção II-2-E do *Anexo II*.

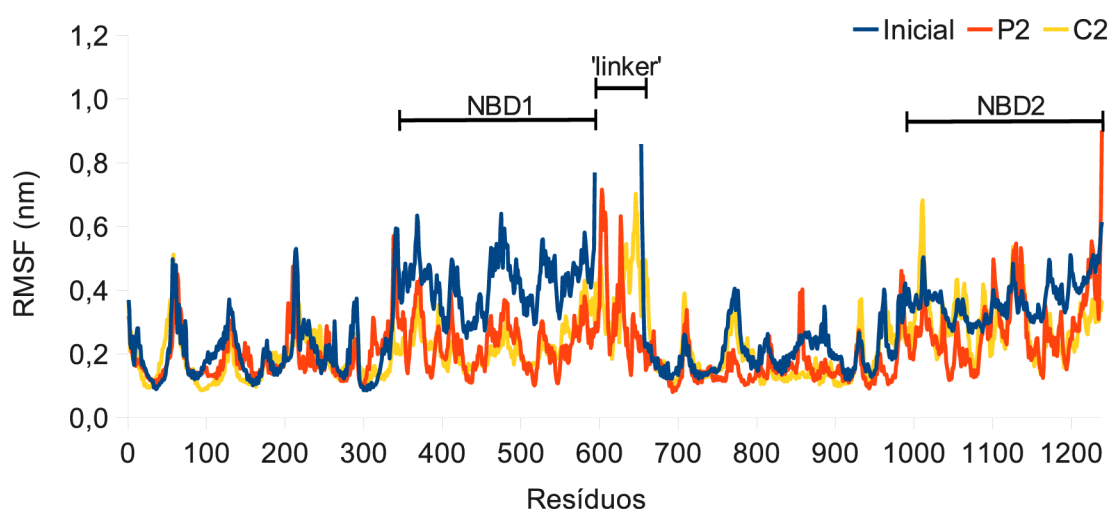


**Gráfico 20** - Variação da distância mínima entre os aminoácidos envolvidos na formação de pontes de hidrogénio 'linker'/NBD, na simulação C2.

Similarmente, a análise da simulação P1 (Secção II-2-B do *Anexo II*) demonstra a formação de pontes de hidrogénio na zona de contacto CS1 (Asp613/His1196 e Asp616/Ser1036), não sendo discerníveis a formação das pontes de hidrogénio identificadas na simulação anterior. Como alternativa, e após a análise visual da estrutura final, é identificável a formação de uma superfície de contacto alternativa (designada por CS2') entre os aminoácidos Asn603/Gly1143/Asp1171 e Glu604/Gly1142), com a manutenção do ponto de contacto entre a Cys637/Glu219. A menor distorção desta estrutura em comparação com a simulação C2 implica directamente a formação das pontes de hidrogénio em ambas as superfícies como um requisito importante na estabilização efectiva dos NBD. De igual modo, a simulação C1 (secção II-2-C do *Anexo II*) apresenta dados concordantes com os anteriores, embora as superfícies de contacto não se encontrem definidas como nos casos anteriores. Neste último caso, a matriz de pontes de hidrogénio da superfície CS1

encontra-se aumentada com a formação de pontes de hidrogénio desde o contacto entre Lys607/Leu1170/Glu1175 até ao Asn614/His1196, ocorrendo a partir dos 80 ns contactos adicionais entre o aminoácido Glu611 e a tríade Thr1167/Ser1168/Arg1197.

Os resultados descritos são também observáveis na evolução da flutuação quadrática média (RMSF) das estruturas com e sem segmento intermédio (**Gráfico 21**). A ausência do *linker* origina oscilações de maior amplitude na estrutura proteica, concentradas sobretudo no NBD1 mas também no NBD2.

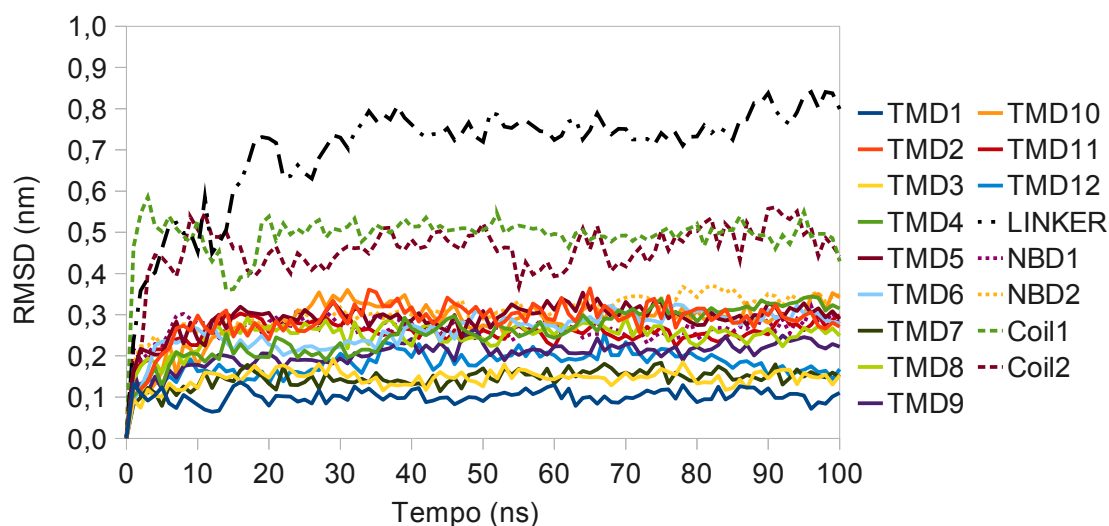


**Gráfico 21** - Comparação dos RMSF dos resíduos para as diferentes simulações.

A adição da respectiva sequência permite uma maior estabilização da estrutura ao nível dos NBD1 e NBD2, com a maior parte da flutuação sendo transferida dos NBD para os resíduos que constituem o segmento intermédio. A análise do RMSF permite também verificar a elevada estabilidade dos domínios citosólicos da P-gp e a baixa flutuação dos TMD, prova inequívoca do efeito da presença da membrana na estabilização das hélices transmembranares. Estes resultados demonstram também a necessidade da inserção do *linker* na estrutura, servindo como ponto de apoio fulcral e permitindo uma influência recíproca e dinâmica entre os dois domínios que, na sua ausência, se encontrariam demasiado afastados para uma interacção eficaz.

A observação do elevado RMSD pode induzir erroneamente a percepção de que existe um elevado desvio da estrutura em relação às coordenadas iniciais. No entanto, se o fraccionarmos pelos diferentes componentes que lhe dão origem (**Gráfico 22**) verificamos que o segmento intermédio possui uma contribuição de 25 a 30% para o valor total em

ambas as simulações (valores para as restantes disponíveis no Anexo II). Os segmentos de ligação entre o TMD6-NBD1 (*Coil1*) e TMD12-NBD2 (*Coil2*) contribuem igualmente com 10 a 15% do valor. A única diferença marcada verifica-se no comportamento do segmento de ligação *Coil2*, cujos valores na C2 são inferiores, comparáveis aos TMD.

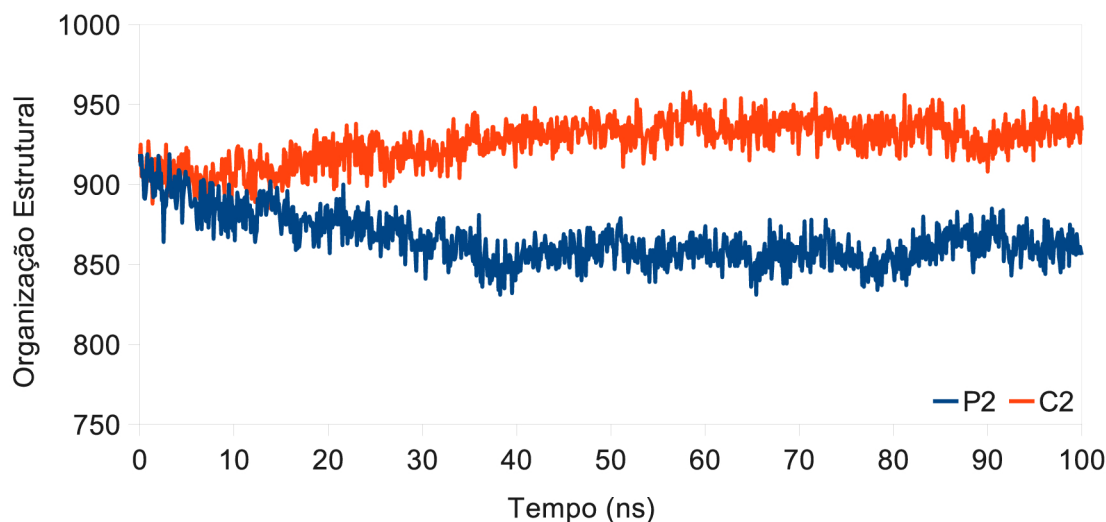


**Gráfico 22** - RMSD dos diferentes componentes da P-gp na simulação P2.

Os dados permitem a observação de que os segmentos transmembranares cujo desvio é menor em relação à estrutura inicial são os TMD 1, 3, 7, 9 e 12 na simulação P2, não se observando diferenças significativas entre os diversos segmentos na C2. Já os TMD 5, 8, 10 e 11, que diversos estudos indicam como fazendo parte do DBS<sup>88</sup> e o TMD 6, implicado no processo de alteração conformacional em conjunto com o TMD 12<sup>12,89</sup>, apresentam desvios semelhantes, indiciando movimentos coordenados entre as hélices transmembranares em resposta a um estímulo ou a uma perturbação do sistema.

Outro dado interessante prende-se com a evolução da estrutura secundária da proteína ao longo do tempo, sendo observados resultados bastante distintos em ambas as simulações. O **Gráfico 23** apresenta a evolução global da estrutura secundária, resultado do somatório entre o número de resíduos que participam na formação de hélices  $\alpha$ , folhas e pontes  $\beta$  e ansas (*loops*).

A variação na simulação P2 pode ser explicada pela passagem de alguns segmentos helicoidais para a conformação desenrolada, sobretudo nos TMD 6 e 12 e no segmento intermédio com pouca variação na evolução das restantes estruturas. É discernível um ponto de inflexão aos 40 ns de simulação, com a estabilização dos valores até ao final.



**Gráfico 23** - Evolução da organização da estrutura secundária ao longo do tempo, para as simulações P2 e C2.

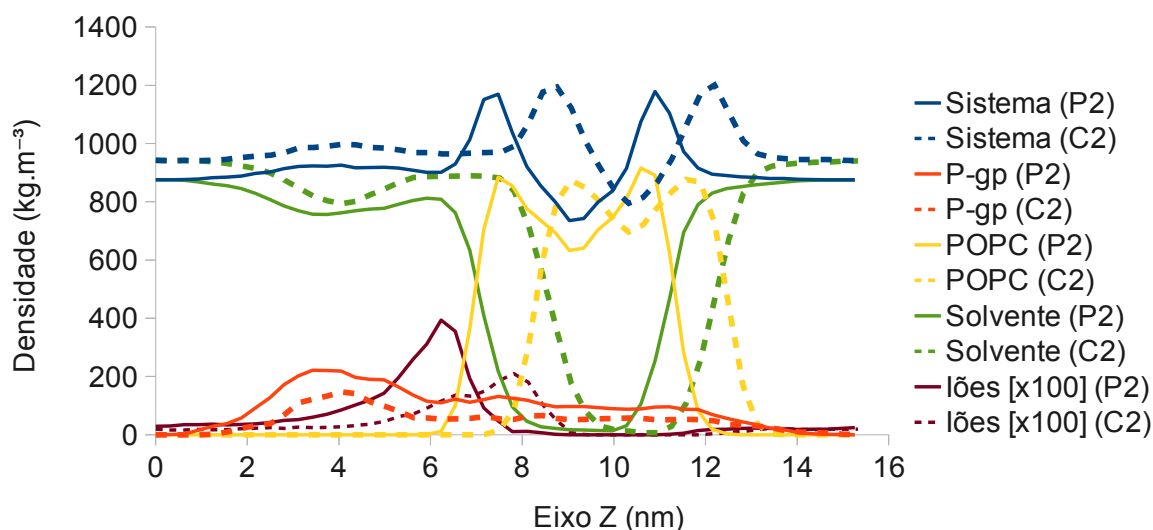
A simulação C2, pelo contrário, apresenta um padrão oposto, ocorrendo uma evolução progressiva no sentido de formação de hélices, mais estáveis e favorecidas pelo campo de forças utilizado, o que demonstra de forma inequívoca as diferenças entre o GROMOS96 e o CHARMM27 e comprova os resultados obtidos anteriormente sobre a influência dos campos de força utilizados na estabilidade da estrutura secundária.

A análise das simulações em ambos os campos de força revela uma outra diferença, relacionada com o posicionamento da membrana em relação à estrutura proteica. Através do cálculo da densidade dos diferentes componentes do sistema (**Gráfico 24**), e tendo como referência a posição semelhante da proteína em ambos os sistemas, é observável um desvio na posição da membrana de cerca de 1,6 Å na interface interna e 1,0 Å na interface externa, devido à alteração na espessura da membrana durante as simulações.

A distribuição dos íons cloreto na simulação revela também uma maior acumulação destes junto da face interna da membrana, indiciando a prevalência de aminoácidos com carga positiva nessa localização específica, ao invés da sua distribuição uniforme por toda a caixa de simulação.

O efeito que o protocolo de equilíbrio tem na estabilidade da simulação pode também ser avaliado através do cálculo da área acessível pelo solvente (SAS). A análise do gráfico da variação global da SAS nas simulações P1 e P2 não revela diferenças significativas em relação aos valores finais, existindo no entanto uma maior área exposta ao solvente nos primeiros 10 ns da simulação P2 (**Gráfico 25**), com igual contribuição dos resíduos

hidrofílicos e hidrofóbicos.

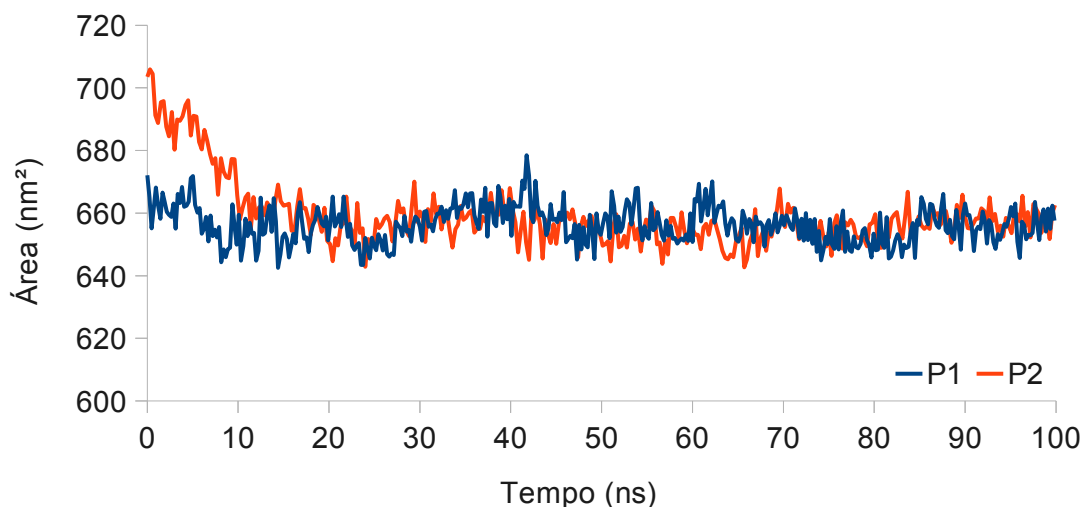


**Gráfico 24** - Densidades dos diversos componentes do sistema para os campos de força GROMOS96 (P2) e CHARMM27 (C2).

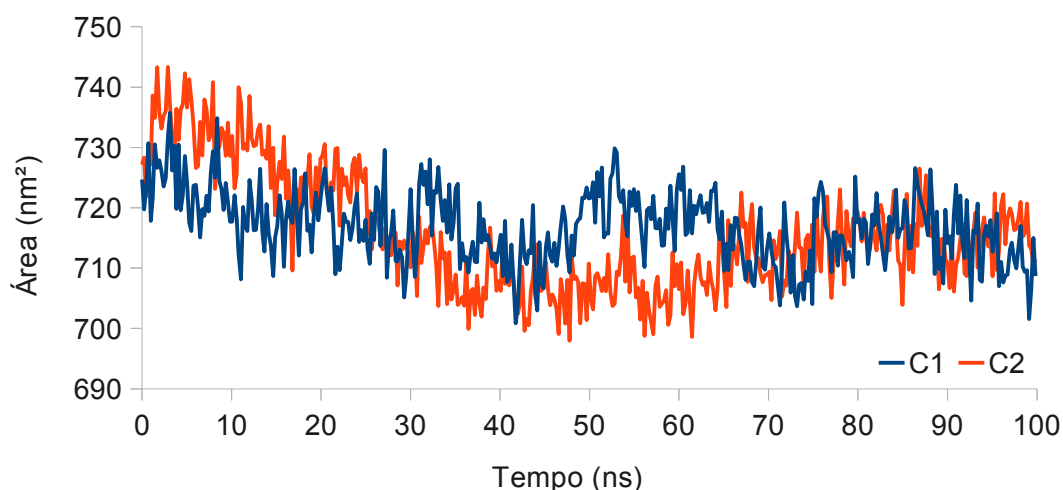
Nas simulações C1 e C2, a variação inicial é menos acentuada, existindo no entanto uma maior redução na SAS com a aplicação do protocolo de minimização energética na simulação C2. Este comportamento é distinto das simulações anteriores, porque enquanto que na simulação P2 a minimização aumentou a área da proteína exposta ao solvente, na C2 a minimização não provocou alterações significativas na área exposta inicial, mas permitiu uma diminuição da área exposta no final da simulação, fornecendo indicações de uma maior compactação da estrutura final (**Gráfico 26**).

A inversão visível a partir dos 27 ns entre as simulações C1 e C2 ( resulta da formação estável de pontes de hidrogénio na superfície de contacto CS1, nomeadamente entre os resíduos Asp616 e os resíduos de Ser1035/1036 e Gly1037 (**Gráfico 20**), reduzindo a exposição ao solvente dos resíduos envolvidos. Com o decorrer da simulação, o afastamento das hélices exteriores no NBD2 e a não existência de pontes de hidrogénio na superfície CS2 (**Gráfico 20**) contribui para a inversão desta tendência e, concomitantemente, para a menor diferença registada entre as simulações a partir dos 70 ns até ao final. Na simulação C1, a maior parte dos pontos de contacto encontram-se estabelecidos desde os 20 ns, pelo que a contribuição de pontes de hidrogénio adicionais formadas no decorrer da simulação vai contribuir para uma maior estabilização da estrutura, contribuindo para a pouca variação entre os valores iniciais e finais registados

(dados apresentados na secção II-2-C do Anexo II).



**Gráfico 25** - Área global acessível pelo solvente (SAS) para as simulações P1 e P2.



**Gráfico 26** - Área global acessível pelo solvente (SAS) para as simulações C1 e C2.

Relativamente à barreira hidrofóbica que mantinha o poro encerrado na simulação inicial, os dados subsequentes não permitiram confirmar a presença desta estrutura. Nas simulações C2, P1 e P2 o poro mantém-se fechado, não sendo possível a identificação de resíduos comuns que contribuam para a formação da barreira. Na simulação C1, não se verifica a formação da barreira, existindo uma continuidade de moléculas de água que ligam ambos os lados da membrana. Os resultados sugerem que pode existir uma contribuição efectiva das cadeias laterais de determinados aminoácidos na formação de uma barreira que impeça o contacto entre o interior e o exterior celular, sendo no entanto necessários estudos mais aprofundados para esclarecer o papel destes aminoácidos no

mecanismo de funcionamento da P-gp.

**3.4. Discussão dos resultados.** Com o presente trabalho pretendemos, através de simulações por dinâmica molecular, obter uma estrutura final equilibrada da P-gp murina por forma a possibilitar futuros trabalhos de homologia, *docking* molecular e *virtual screening*. A estrutura cristalográfica apresenta 89% de homologia com a P-gp humana, encontrando-se no entanto incompleta, com a omissão da sequência entre os aminoácidos 627 e 683 e a correspondente estrutura secundária. A cristalização da proteína na ausência de uma membrana lipídica e a resolução do cristal a partir do qual foi obtida (3,80 Å) são igualmente problemas cuja avaliação prévia foi necessária.

A simulação da proteína na ausência da membrana e do *linker* confirmou a necessidade da execução de testes mais aprofundados, por forma a obter a estabilidade estrutural do transportador para as simulações subsequentes. A sequência intermédia foi modelada com recurso a programas informáticos de previsão de estruturas secundárias, tendo sido executadas diversas simulações para avaliar a estabilidade e a influência das diversas conformações obtidas, tendo sido escolhido aquele cujos dados se apresentaram como mais favoráveis. De igual modo, as propriedades das membranas e dos lípidos que as constituem foram igualmente avaliadas, tendo sido escolhida a membrana de POPC por esta apresentar as características ideais. Os campos de forças (GROMOS96 com parametrização lipídica desenvolvida por Poger *et al.* e CHARMM27) foram utilizados na construção de sistemas para corridas de produção, permitindo a avaliação concreta da exequibilidade da tarefa e da influência que a escolha do campo teve na estabilidade e nos parâmetros avaliados.

Foi ainda desenvolvido um protocolo de minimização da estrutura proteica, por forma a otimizar e conferir robustez ao sistema, permitindo assim minimizar problemas que pudessem advir da baixa resolução da estrutura cristalográfica.

Os resultados obtidos permitiram a obtenção de diversas estruturas estáveis, mas mais importante permitiram a caracterização de alguns dos problemas inerentes à simulação deste tipo de transportadores. Uma das inovações deste estudo é a clarificação da importância da sequência de ligação na estabilidade da estrutura, através da contribuição para a correta inserção da proteína na membrana e da estabilização de ambos os domínios intra-celulares (domínios de ligação aos nucleótidos, ou NBD). A importância de



pontes de hidrogénio específicas entre resíduos existentes no segmento intermédio e NBD terminal foi também clarificada, contribuindo desta forma para estudos posteriores acerca da elucidação do mecanismo de transporte dos substratos.

Os valores elevados dos desvios quadráticos médios e correspondentes raios de giração corroboram a grande mobilidade que toda a estrutura possui, embora a sua integridade estrutural não sofra muitas alterações. A presença do *linker* permite uma maior estabilização dos NBD devido à transferência de grande parte das oscilações estruturais para a sequência intermédia, altamente móvel. Estes dados são corroborados pela análise dos desvios dos diferentes componentes em separado, que comprovam quer a elevada estabilidade dos segmentos inseridos na membrana quer a grande mobilidade do segmento intermédio e dos segmentos de ligação entre as hélices transmembranares e os domínios de ligação a nucleótidos.

## REFERÊNCIAS

- (1) J.D. Faraldo-Gómez, G.R. Smith, M.S.P. Sansom, Setting up and optimization of membrane protein simulations., *European Biophysical Journal*, **2002**, 31, 217-227, doi:10.1007/s00249-002-0207-5.
- (2) S.H. White, Biophysical dissection of membrane proteins., *Nature*, **2009**, 459, 344-346, doi:10.1038/nature08142.
- (3) S.H. White, Membrane Proteins of Known 3D Structure, **2011** (<http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>, accessed on 2011/08/01).
- (4) H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The Protein Data Bank., *Nucleic Acids Research*, **2000**, 28, 235-242, doi:10.1093/nar/28.1.235.
- (5) A.E. Senior, M.K. Al-Shawi, I.L. Urbatsch, ATP Hydrolysis by Multidrug-Resistance Protein from Chinese Hamster Ovary Cells., *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **1995**, 27, 31-36.
- (6) I.L. Urbatsch, A.E. Senior, Effects of Lipids on ATPase Activity of Purified Chinese Hamster P-Glycoprotein., *Archiv der Pharmazie*, **1995**, 316, 135-140, doi:10.1006/abbi.1995.1020.
- (7) A. Ivetac, M.S.P. Sansom, Molecular dynamics simulations and membrane protein structure quality., *European Biophysical Journal*, **2008**, 37, 403-409, doi:10.1007/s00249-007-0225-4.
- (8) R.J. Law, C. Capener, M. Baaden, P.J. Bond, J. Campbell, G. Patargias, Y. Arinaminpathy, M.S.P. Sansom, Membrane protein structure quality in molecular dynamics simulation., *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **2005**, 24, 157-165, doi:10.1016/j.jmgm.2005.05.006.
- (9) G.F. Ecker, T. Stockner, P. Chiba, Computational models for prediction of interactions with ABC-transporters., *Drug Discovery Today*, **2008**, 13, 311-317, doi:10.1016/j.drudis.2007.12.012.
- (10) K.P. Locher, A.T. Lee, D.C. Rees, The E. coli BtuCD Structure: A Framework for ABC Transporter Architecture and Mechanism., *Science*, **2002**, 296, 1091-1098, doi:10.1126/science.1071142.
- (11) G. Chang, Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation., *Journal of Molecular Biology*, **2003**, 330, 419-430.
- (12) E. Crowley, R. Callaghan, Multidrug efflux pumps: drug binding – gates or cavity?, *FEBS Journal*, **2010**, 277, 530-539, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07484.x.
- (13) E.R. Lindahl, In *Molecular Modelling of Proteins*, Vol. 443, A. Kukol, Ed., Humana Press, **2008**, pages 3-24.
- (14) J.E. Jones, On the Determination of Molecular Fields. I. From the Variation of the Viscosity of a Gas with Temperature., *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, **1924**, 106, 441-462,

doi:10.1098/rspa.1924.0081.

- (15) I.E. Dzyaloshinskii, E.M. Lifshitz, L.P. Pitaevskii, General Theory of van der Waals Forces., *Soviet Physics Uspekhi*, **1961**, 4, 153-176, doi:10.1070/PU1961v004n02ABEH003330.
- (16) J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti, H.J.C. Berendsen, Numerical-integration Of Cartesian Equations Of Motion Of A System With Constraints - Molecular-dynamics Of N-alkanes., *Journal of Computational Physics*, **1977**, 23, 327-341, doi:10.1016/0021-9991(77)90098-5.
- (17) B. Hess, H. Bekker, H.J.C. Berendsen, J.G.E.M. Fraaije, LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations., *Journal of Computational Chemistry*, **1997**, 18, 1463-1472.
- (18) B. Hess, P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation., *Journal of Chemical Theory and Computation*, **2008**, 4, 116-122, doi:10.1021/ct700200b.
- (19) C.J. Cramer, *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*, John Wiley & Sons, **2002**.
- (20) T. Darden, D. York, L. Pedersen, Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems., *Journal of Chemical Physics*, **1993**, 98, 10089-10092, doi:10.1063/1.464397.
- (21) U. Essmann, L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L.G. Pedersen, A smooth particle mesh Ewald method., *Journal of Chemical Physics*, **1995**, 103, 8577-8593.
- (22) P.K. Weiner, P. Kollman, AMBER: Assisted Model Building with Energy Refinement. A General Program for Modeling Molecules and Their Interactions., *Journal Of Computational Chemistry*, **1981**, 2, 287-303.
- (23) S.J. Weiner, P.A. Kollman, D.A. Case, U.C. Singh, C. Ghio, G. Alagona, S. Profeta Jr., P.K. Weiner, A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins., *Journal of American Chemical Society*, **1984**, 106, 765-784, doi:10.1021/ja00315a051.
- (24) S.J. Weiner, P.A. Kollman, D.T. Nguyen, D.A. Case, An All Atom Force Field for Simulations of Proteins and Nucleic Acids., *Journal Of Computational Chemistry*, **1986**, 7, 230-252, doi:10.1080/00268978300102851.
- (25) W.L. Jorgensen, J. Tirado-Rives, The OPLS Force Field for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin., *Journal of American Chemical Society*, **1988**, 110, 1657-1666.
- (26) W.L. Jorgensen, D.S. Maxwell, J. Tirado-Rives, Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids., *Journal of American Chemical Society*, **1996**, 118, 11225-11236, doi:10.1021/ja9621760.
- (27) B.R. Brooks, R.E. Bruccoleri, D.J. Olafson, D.J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, B. Roux, CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations., *Journal of Computational Chemistry*, **1983**, 4, 187-217, doi:10.1002/jcc.540040211.

- (28) A.D. MacKerel Jr., C.L. Brooks III, L. Nilsson, Y. Won, M. Karplus, B. Roux Vol. 1, P. v. R. Schleyer et al., Ed., John Wiley & Sons: Chichester, **1998**, pages 271-277.
- (29) B.R. Brooks, C.L. Brooks III, A.D. Mackerell Jr., L. Nilsson, R.J. Petrella, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caflisch, L. Caves, Q. Cui, A.R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R.W. Pastor, C.B. Post, J.Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R.M. Venable, H.L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D.M. York, M. Karplus, B. Roux, CHARMM: The Biomolecular Simulation Program., *Journal Of Computational Chemistry*, **2009**, *30*, 1545-1614, doi:10.1002/jcc.21287.
- (30) X. Daura, B. Oliva, E. Querol, F.X. Avilés, O. Tapia, On the sensitivity of MD trajectories to changes in water-protein interaction parameters: the potato carboxypeptidase inhibitor in water as a test case for the GROMOS force field., *Proteins*, **1996**, *25*, 89-103, doi:10.1002/(SICI)1097-0134(199605)25:1<89::AID-PROT7>3.0.CO;2-F.
- (31) C. Oostenbrink, A. Villa, A.E. Mark, W.F. van Gunsteren, Parametrization of Aliphatic CH<sub>n</sub> United Atoms of GROMOS96 Force Field., *Journal of Computational Chemistry*, **1998**, *19*, 535-547, doi:10.1002/(SICI)1096-987X(19980415)19:5<535::AID-JCC6>3.0.CO;2-N.
- (32) W.R.P. Scott, P.H. Hunenberger, I.G. Tironi, A.E. Mark, S.R. Billeter, J. Fennen, A.E. Torda, T. Huber, P. Kruger, W.F. van Gunsteren, The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package., *Journal of Physical Chemistry A*, **1999**, *103*, 3596-3607, doi:10.1021/jp984217f.
- (33) I. Chandrasekhar, D. Bakowies, A. Glattli, P. Hunenberger, C. Pereira, W.F. van Gunsteren, The GROMOS96 benchmarks for molecular simulation., *Computer Physics Communications*, **2000**, *128*, 550-557.
- (34) C. Oostenbrink, A. Villa, A.E. Mark, W.F. van Gunsteren, A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6., *Journal of computational chemistry*, **2004**, *25*, 1656-76, doi:10.1002/jcc.20090.
- (35) S.J. Marrink, H.J. Risselada, S. Yefimov, D.P. Tieleman, A.H. de Vries, The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations., *Journal of Physical Chemistry B*, **2007**, *111*, 7812-7824, doi:10.1021/jp071097f.
- (36) J.B. Klauda, R.M. Venable, J.A. Freites, J.W. O'Connor, D.J. Tobias, C. Mondragon-Ramirez, I. Vorobyov, A.D. MacKerel Jr., R.W. Pastor, Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types., *Journal of Physical Chemistry B*, **2010**, *114*, 7830-7843, doi:10.1021/jp101759q.
- (37) O. Berger, O. Edholm, F. Jahnig, Molecular Dynamics Simulations of a Fluid Bilayer of Dipalmitoylphosphatidylcholine at Full Hydration, Constant Pressure, and Constant Temperature., *Biophysical Journal*, **1997**, *72*, 2002-2013, doi:10.1016/S0006-3495(97)78845-3.
- (38) I. Chandrasekhar, M. Kastenholtz, R.D. Lins, C. Oostenbrink, L.D. Schuler, D.P. Tieleman, W.F. van Gunsteren, A consistent potential energy parameter set for lipids - dipalmitoylphosphatidylcholine as a benchmark for the GROMOS96 45A3 force

- p field.,
- European Biophysics Journal*
- ,
- 2003**
- , 32, 67-77, doi:10.1007/s00249-002-0269-4.
- (39) I. Chandrasekhar, D. Bakowies, A. Glattli, P. Hunenberger, C. Pereira, W.F. van Gunsteren, Molecular dynamics simulation of lipid bilayers with GROMOS96: Application of surface tension., *Molecular Simulations*, **2005**, 31, 543-548, doi:10.1080/08927020500134243.
  - (40) J.P. Ulmschneider, M.B. Ulmschneider, United Atom Lipid Parameters for Combination with the Optimized Potentials for Liquid Simulations All-Atom Force Field., *Journal of Chemical Theory Computational*, **2009**, 5, 1803-1813, doi:10.1021/ct900086b.
  - (41) S.-W. Chiu, S.A. Pandit, H.L. Scott, E. Jakobsson, An Improved United Atom Force Field for Simulation of Mixed Lipid Bilayers., *Journal of Physical Chemistry B*, **2009**, 113, 2748-2763, doi:10.1021/jp807056c.
  - (42) A. Kukol, Lipid Models for United-Atom Molecular Dynamics Simulations of Proteins., *Journal of Chemical Theory and Computation*, **2009**, 5, 615-626.
  - (43) I. Chandrasekhar, C. Oostenbrink, W.F. van Gunsteren, Simulating the physiological phase of hydrated DPPC bilayers: The ester moiety., *SOFT MATER*, **2004**, 2, 27-45, doi:10.1081/SMTS-120030764.
  - (44) W.R.P. Scott, P.H. Hunenberger, I.G. Tironi, A.E. Mark, S.R. Billeter, J. Fennen, A.E. Torda, T. Huber, P. Kruger, W.F. van Gunsteren, A New Force Field for Simulating Phosphatidylcholine Bilayers., *Journal of Computational Chemistry*, **2010**, 31, 1117-1125, doi:10.1002/jcc.21396.
  - (45) D. Poger, A.E. Mark, On the Validation of Molecular Dynamics Simulations., *Journal of Chemical Theory and Computation*, **2010**, 6, 325-336, doi:10.1021/ct900487a.
  - (46) *Molecular Operating Environment (MOE) v2009.10*, Chemical Computing Group Inc, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, **2009**.
  - (47) H.J.C. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation., *Computer Physics Communications*, **1995**, 91, 43-56.
  - (48) E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel, GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis., *Journal of Molecular Modelling*, **2001**, 7, 306-317, doi:10.1007/s008940100045.
  - (49) D.V.D. Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, H.J.C. Berendsen, GROMACS: Fast, Flexible, and Free., *Journal of Computational Chemistry*, **2005**, 26, 1701-1718, doi:10.1002/jcc.20291.
  - (50) C. Kandt, W.L. Ash, D.P. Tieleman, Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins., *Methods*, **2007**, 41, 475-488, doi:10.1016/j.ymeth.2006.08.006.
  - (51) W.J. Allen, J.A. Lemkul, D.R. Bevan, GridMAT-MD: A Grid-Based Membrane Analysis Tool for Use With Molecular Dynamics., *Journal of Computational Chemistry*, **2008**, 30, 1952-1958, doi:10.1002/jcc.21172.
  - (52) W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD - Visual Molecular Dynamics., *Journal of*

*Molecular Graphics*, **1996**, 14, 33-38.

- (53) S. Miyamoto, P.A. Kollman, Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models., *Journal of Computational Chemistry*, **1992**, 13, 952-962, doi:10.1002/jcc.540130805.
- (54) G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello, Canonical sampling through velocity rescaling., *Journal of Chemical Physics*, **2007**, 126, 14101-14107, doi:10.1063/1.2408420.
- (55) S. Nosé, A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble., *Molecular Physics*, **2002**, 100, 191-198, doi:10.1080/00268970110089108.
- (56) W.G. Hoover, Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions., *Physical Reviews A*, **1985**, 31, 1695-1697, doi:10.1103/PhysRevA.31.1695.
- (57) S. Nose, M.L. Klein, Constant Pressure Molecular-Dynamics For Molecular-Systems., *Molecular Physics*, **1983**, 50, 1055-1076, doi:10.1080/00268978300102851.
- (58) M. Parrinello, A. Rahman, Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method., *Journal of Applied Physics*, **1981**, 52, 7182-7190.
- (59) B. Petersen, T.N. Petersen, P. Andersen, M. Nielsen, C. Lundegaard, A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions., *BMC Structural Biology*, **2009**, 9, 51, doi:10.1186/1472-6807-9-51.
- (60) G.P.S. Raghava, APSSP2: A combination method for protein secondary structure prediction based on neural network and example based learning., *CASP5*, **2002**, A-132.
- (61) M. Ouali, R.D. King, Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction., *Protein Science*, **2000**, 9, 1162-1176.
- (62) P.Y. Chou, G.D. Fasman, Prediction of protein conformation., *Biochemistry*, **1974**, 13, 222-245, doi:10.1021/bi00699a002.
- (63) H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, A. DiNola, J.R. Haak, Molecular dynamics with coupling to an external bath., *Journal of Chemical Physics*, **1984**, 81, 3684-3691, doi:10.1063/1.448118.
- (64) S. Kirkpatrick, C.D. Gelatt, M.P. Vecchi, Optimization by simulated annealing., *Science*, **1983**, 220, 671-80, doi:10.1126/science.220.4598.671.
- (65) S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall III, P.I.W. de Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson, D.C. Richardson, Structure validation by C $\alpha$  geometry:  $\phi$ ,  $\psi$  and C $\beta$  deviation., *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **2003**, 50, 437-450, doi:10.1002/prot.10286.
- (66) M.G. Wolf, M. Hoefling, G. Groenhof, C. Aponte-Santamaría, H. Grubmüller, g\_membed: Efficient Insertion of a Membrane Protein into an Equilibrated Lipid Bilayer with Minimal Perturbation., *Journal of Computational Chemistry*, **2010**, 31, 2169-2174, doi:10.1002/jcc.21507.
- (67) M.F. Rosenberg, G. Velarde, R.C. Ford, C. Martin, G. Berridge, I.D. Kerr, R. Callaghan, A. Schmidlin, C. Wooding, K.J. Linton, C.F. Higgins, Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle., *EMBO Journal*, **2001**,

20, 5615-5625.

- (68) R. Callaghan, R.C. Ford, I.D. Kerr, The translocation mechanism of P-glycoprotein., *FEBS Letters*, **2006**, 580, 1056-1063, doi:10.1016/j.febslet.2005.11.083.
- (69) C.A. Hrycyna, L.E. Airan, U.A. Germann, S.V. Ambudkar, I. Pastan, M.M. Gottesman, Structural flexibility of the linker region of human P-glycoprotein permits ATP hydrolysis and drug transport., *Biochemistry*, **1998**, 37, 13660–13673, doi:10.1021/bi9808823.
- (70) T. Sato, A. Kodan, Y. Kimura, K. Ueda, T. Nakatsu, H. Kato, Functional role of the linker region in purified human P-glycoprotein., *FEBS Journal*, **2009**, 276, 3504–3516, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07072.x.
- (71) K. Klappe, I. Hummel, D. Hoekstra, J.W. Kok, Lipid dependence of ABC transporter localization and function., *Chemistry and Physics of Lipids*, **2009**, 161, 57-64, doi:10.1016/j.chemphyslip.2009.07.004.
- (72) S.V. Ambudkar, S. Dey, C.A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan, M.M. Gottesman, Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter., *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, **1999**, 39, 361-398, doi:10.1146/annurev.pharmtox.39.1.361.
- (73) A. Seelig, Unraveling membrane-mediated substrate-transporter interactions., *Biophysical Journal*, **2006**, 90, 3825-3826, doi:10.1529/biophysj.106.082008.
- (74) M.A. Lomize, A.L. Lomize, I.D. Pogozheva, H.I. Mosberg, OPM: orientations of proteins in membranes database., *Bioinformatics*, **2006**, 22, 623-5, doi:10.1093/bioinformatics/btk023.
- (75) G. Pabst, M. Rappolt, H. Amenitsch, P. Laggner, Structural information from multilamellar liposomes at full hydration: Full q-range fitting with high quality x-ray data., *Physical Reviews E*, **2000**, 62, 4000-4009.
- (76) N. Kucerka, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle, Structure of Fully Hydrated Fluid Phase Lipid Bilayers with Monounsaturated Chains., *Journal of Membrane Biology*, **2005**, 208, 193-202, doi:10.1007/s00232-005-7006-8.
- (77) N. Kucerka, Y. Liu, N. Chu, H.I. Petrache, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle, Structure of Fully Hydrated Fluid Phase DMPC and DLPC Lipid Bilayers Using X-Ray Scattering from Oriented Multilamellar Arrays and from Unilamellar Vesicles., *Biophysical Journal*, **2005**, 88, 2626-2637, doi:10.1529/biophysj.104.056606.
- (78) D. Duque, X.-jun Li, K. Katsov, M. Schick, Molecular theory of hydrophobic mismatch between lipids and peptides., *Journal Of Chemical Physics*, **2002**, 116, 10478-10484, doi:10.1063/1.1477927.
- (79) P. Risé, S. Eligini, S. Ghezzi, S. Colli, C. Galli, Fatty acid composition of plasma, blood cells and whole blood: Relevance for the assessment of the fatty acid status in humans., *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **2007**, 76, 363-369, doi:10.1016/j.plefa.2007.05.003.
- (80) Z.V. Leonenko, E. Finot, H. Ma, T.E.S. Dahms, D.T. Cramb, Investigation of Temperature-Induced Phase Transitions in DOPC and DPPC Phospholipid Bilayers

- Using Temperature-Controlled Scanning Force Microscopy., *Biophysical Journal*, **2004**, 86, 3783–3793, doi:10.1529/biophysj.103.036681.
- (81) S. Leekumjorn, A.K. Sum, Molecular Characterization of Gel and Liquid-Crystalline Structures of Fully Hydrated POPC and POPE Bilayers., *Journal of Physical Chemistry B*, **2007**, 111, 6026-6033, doi:10.1021/jp0686339.
- (82) J. Seelig, N. Waespe-Sarcevic, Molecular order in cis and trans unsaturated phospholipid bilayers., *Biochemistry*, **1978**, 17, 3310–3315, doi:10.1021/bi00609a021.
- (83) B. Rost, G. Yachdav, J. Liu, The PredictProtein server., *Nucleic acids research*, **2004**, 32, W321-6, doi:10.1093/nar/gkh377.
- (84) S.G. Aller, J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, P.M. Harrell, Y.T. Trinh, Q. Zhang, I.L. Urbatsch, G. Chang, Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding., *Science*, **2009**, 323, 1718-1722, doi:10.1126/science.1168750.
- (85) Z.E. Sauna, M.M. Smith, M. Muller, K.M. Kerr, S.V. Ambudkar, The Mechanism of Action of Multidrug-Resistance-Linked P-Glycoprotein., *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **2001**, 33, 481-491, doi:10.1023/A:1012875105006.
- (86) A.D. MacKerell, D. Bashford, R.L. Dunbrack, J.D. Evanseck, M.J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F.T.K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D.T. Nguyen, B. Prodhom, W.E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J.C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiórkiewicz-Kuczera, D. Yin, M. Karplus, All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins., *Journal of Physical Chemistry B*, **1998**, 102, 3586-3616, doi:10.1021/jp973084f.
- (87) J. Wang, P. Cieplak, P. a Kollman, How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules?, *Journal of Computational Chemistry*, **2000**, 21, 1049, doi:10.1002/1096-987X(200009)21:12<1049::AID-JCC3>3.3.CO;2-6.
- (88) F.J. Sharom, The P-glycoprotein Efflux Pump: How Does it Transport Drugs?, *Journal of Membrane Biology*, **1997**, 160, 161-175.
- (89) E. Crowley, M.L. O'Mara, C. Reynolds, D.P. Tieleman, J. Storm, I.D. Kerr, R. Callaghan, Transmembrane Helix 12 Modulates Progression of the ATP Catalytic Cycle in ABCB1., *Biochemistry*, **2009**, 48, 6249–6258, doi:10.1021/bi900373x.



## *Capítulo IV*

### *Conclusões e Perspectivas Futuras*



A Glicoproteína-P é uma proteína transmembranar pertencente à família dos transportadores ABC, presentes desde microorganismos simples como bactérias até organismos mais complexos como mamíferos. No caso particular da espécie humana, este transportador é frequentemente associado a fenómenos de multi-resistência à acção de fármacos destinados ao tratamentos de quimioterapia para a erradicação de tumores.

Diversos estudos permitiram o desenvolvimento de moléculas com actividade moduladora da P-gp, organizados em três classes de acordo com os protótipos utilizados. No entanto, os efeitos secundários associados às doses necessárias e à interacção com sistemas enzimáticos, em conjunto com a ausência da estrutura do transportador (cuja versão murina foi publicada em 2009) impediu o desenvolvimento de moduladores mais eficazes que permitissem reverter o fenómeno da MDR.

Uma outra abordagem foi, no entanto, desenvolvida através da obtenção de farmacóforos que permitissem a identificação dos grupos importantes para o reconhecimento das moléculas por parte do transportador. Diversos estudos que identificaram domínios hidrofóbicos, aceitadores e/ou dadores de pontes de hidrogénio como funções-chave na interacção entre os moduladores e o DBS não conseguiram, no entanto, identificar um farmacóforo-base que incluía a maior parte dos moduladores descritos na literatura. Este problema advém do facto dos farmacóforos existentes na literatura terem sido desenvolvidos a partir de conjuntos de moléculas com variações estruturais limitadas, permitindo um desenvolvimento de farmacóforos precisos mas não aplicáveis a compostos de estrutura molecular distinta.

O farmacóforo descrito neste estudo, obtido a partir de moduladores isolados das espécies *Euphorbia* cuja actividade se encontra caracterizada por estudos de reversão da MDR em células transfectadas com o gene MDR1, permite uma melhor caracterização dos domínios essenciais para a modulação da actividade deste tipo de transportadores. Foi identificada a importância dos grupos hidrofóbicos como determinantes no reconhecimento da molécula pelo transportador, sendo o número variável de grupos aceitadores de pontes de hidrogénio responsável pela afinidade que as moléculas apresentam.

A afinidade dos moduladores provou ser também condicionada pela existência de anéis aromáticos, grupos dadores de pontes de hidrogénio e, em menor extensão, por grupos

catiônicos, permitindo a formação de interações electrostáticas adicionais.

Com este farmacóforo, a identificação das características-base cuja presença é essencial em todas as moléculas com actividade inibidora permitirá o aumento da actividade dos moduladores existentes, através da modificação química dos grupos presentes na molécula. Permitirá, de igual modo, a identificação de novas estruturas com potencial actividade moduladora através de técnicas de *screening* virtual, modificadas posteriormente por forma a maximizar o efeito modulador e limitar o aparecimento de efeitos secundários decorrentes da sua utilização como reversores da multi-resistência.

Similarmente, o aumento da base de dados a partir da qual foi possível o desenvolvimento do presente farmacóforo permitirá uma melhor definição dos pontos farmacofóricos determinados, favorecendo a obtenção de um farmacóforo mais preciso e, concomitantemente, uma maior exactidão nas detecções por ele permitidas.

A obtenção da estrutura cristalográfica da Glicoproteína-P murina veio clarificar alguns dos aspectos do transportador que permaneciam obscuros. Muitos dos modelos de homologia não se revelaram adequados para a determinação das propriedades intrínsecas ou do mecanismo de acção que provoca o efluxo dos substratos para o exterior celular. No entanto, numerosos estudos evidenciaram o papel fundamental dos mecanismos de transdução de sinal desencadeados pela ligação dos substratos e do ATP, embora o processo pelo qual ocorre o efluxo não se encontre completamente esclarecido. Por outro lado, a ausência do segmento de ligação entre as duas unidades e a cristalização da proteína na ausência da membrana íntegra são problemas adicionais que importa investigar devido à importância que ambos adquirem no mecanismo de acção, como revelado por vários estudos.

O presente estudo clarificou as propriedades intrínsecas necessárias à membrana para permitir uma estabilização eficiente do transportador. O estudo provou que a membrana de POPC é mais adequada para a simulação deste sistema em particular, em detrimento das membranas de DMPC e DPPC, devido à temperatura de transição de fase mais próxima da temperatura fisiológica e à espessura do núcleo hidrofóbico ser mais próxima da existente nos domínios transmembranares da P-gp. A parametrização da membrana foi também sujeita a análise, tendo sido verificado que a desenvolvida por Poger *et al.* a que apresentou valores de área por lípido, espessura e parâmetros de ordem de deutério mais

próximos dos valores experimentais.

A sequência intermédia foi modelada a partir dos resultados provenientes de programas de predição de estruturas secundárias, equilibrada e a estabilidade da estrutura foi testada através de diversas simulações em paralelo. Confirma-se a existências de duas pequenas hélices no início do segmento que medeiam a interacção entre ambos os NBD, com a restante estrutura a adquirir uma conformação estendida extremamente móvel, como confirmado pela análise da flutuação quadrática média desta sequência em particular.

A estabilidade dos domínios de ligação a nucleótidos é conseguida por intermédio da formação de pontes de hidrogénio em locais designados por superfícies de contacto, localizadas junto do motivo *Walker-A* e das hélices exteriores do NBD2. O número de ponte de hidrogénio estabelecidas e os resíduos envolvidos na formação dos mesmos determinam o número de graus de liberdade permitidos e, consequentemente, a maior ou menor flexibilidade da interacção. Foi também clarificado o papel central dos resíduos Asp613 e Asp616 na superfície de contacto 1, envolvidos na formação de pontes de hidrogénio em todas as simulações, mediadas ou não por moléculas de água, e dos resíduos Arg630 e Thr632 na superfície de contacto 2, embora os contactos nesta superfície não se encontrem tão bem definidos como na primeira.

A obtenção de diversas estruturas finais estáveis do transportador permitirá a sua utilização em futuros estudos de homologia, *docking* e dinâmica molecular. As estruturas obtidas permitem a sua utilização em novos estudos de dinâmica molecular com vista a testar o modelo do *Aspirador Hidrofóbico* e obtenção de uma estrutura da P-gp humana por homologia permitirá efectuar estudos de *docking* para uma melhor compreensão dos mecanismos e resíduos envolvidos no reconhecimento dos substratos e moduladores. Esta nova informação, em conjunto com os dados recolhidos pelo farmacóforo, fornecerão novos dados cujo papel fulcral se centrará no desenvolvimento de novos e melhores moduladores, impedindo o aparecimento ou revertendo fenómenos existentes de multi-resistência em linhas celulares tumorais.

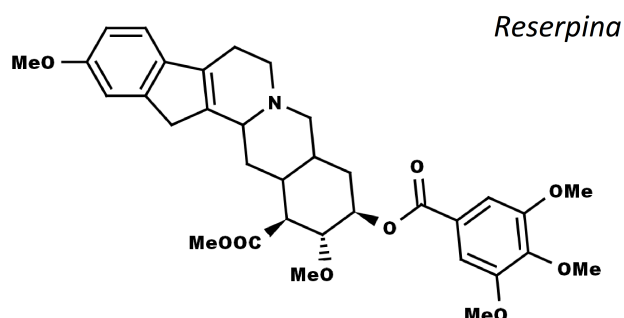
## ***Anexo I***

*Informação de suporte sobre o  
Desenvolvimento doarmacóforo*

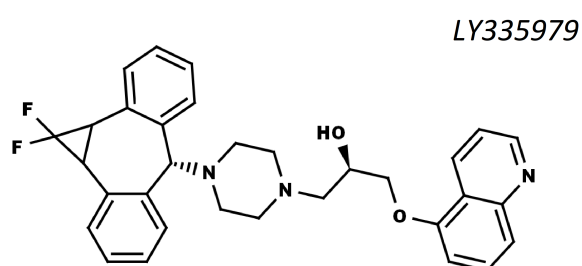


**Grupo Controlo** (N=152) [adaptado de Wang *et al.*<sup>1</sup>]

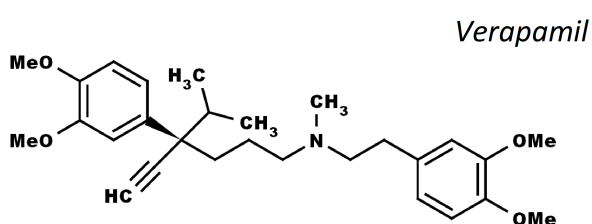
**Subgrupo** S1 (N=7)  
**Referências** Pearce *et al.*, 1989<sup>2</sup>



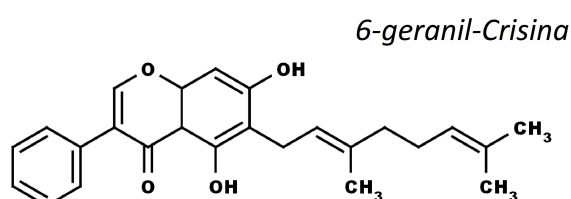
**Subgrupo** S2 (N=9)  
**Referências** Ford, 1996<sup>3</sup>  
Zamora, 1988<sup>4</sup>  
Wang, 2001<sup>5</sup>  
Dantzig, 1996<sup>6</sup>  
van Zuylen, 2002<sup>7</sup>  
Sato, 1991<sup>8</sup>  
Kimura, 2002<sup>9</sup>



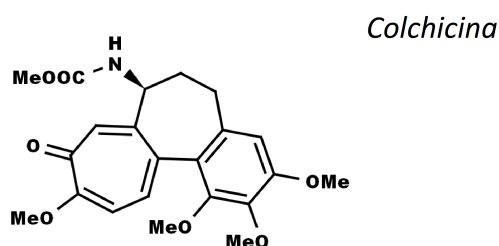
**Subgrupo** S3 (N=11)  
**Referências** Ford, 1996<sup>3</sup>  
Nüssler, 1998<sup>10</sup>  
Safa, 1987<sup>11</sup>  
Zamora, 1988<sup>4</sup>  
Akiyama, 1988<sup>12</sup>  
Chiba, 1996<sup>13</sup>



**Subgrupo** S4 (N=15)  
**Referências** Conseil, 2000<sup>14</sup>  
Wesolowska, 2009<sup>15</sup>



**Subgrupo** S5 (N=11)  
**Referências** Zamora, 1988<sup>4</sup>  
Ekins, 2002<sup>16</sup>  
Beck, 1988<sup>17</sup>  
Scala, 1997<sup>18</sup>  
Garrigues, 2002<sup>19</sup>



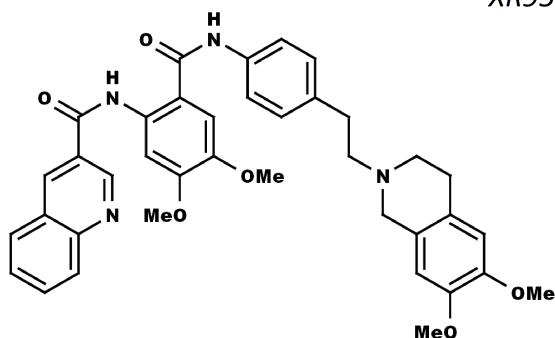


Subgrupo S6 (N=21)

Referências

Ford, 1996<sup>3</sup>  
Mistry, 2001<sup>20</sup>  
Peck, 2001<sup>21</sup>  
Newman, 2000<sup>22</sup>  
Pajeva, 2004<sup>23</sup>  
Mi, 2001<sup>24</sup>  
Drewe, 1999<sup>25</sup>  
Wang, 2002<sup>5</sup>  
Chen, 2003<sup>26</sup>  
Ekins, 2002<sup>16</sup>  
Muñoz-Martinez, 2006<sup>27</sup>  
Qiangrong, 2005<sup>28</sup>  
Tsuruo, 1981<sup>29</sup>

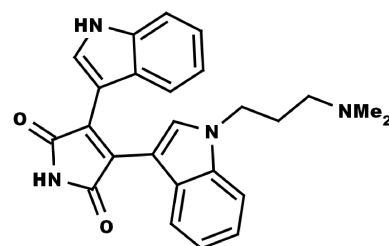
XR9575



Subgrupo  
Referências

S7 (N=9)  
Nüssler, 1998<sup>10</sup>  
Utz, 1998<sup>30</sup>  
Smith, 1995<sup>31</sup>  
Ford, 1996<sup>3</sup>

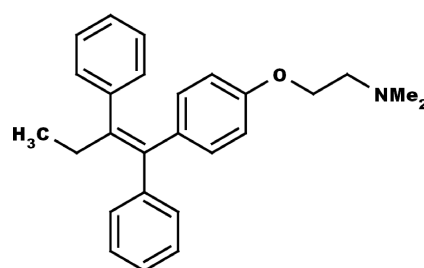
GF109203X



Subgrupo  
Referências

S8 (N=9)  
Nüssler, 1998<sup>10</sup>  
Conseil, 2000<sup>14</sup>  
Beck, 1988<sup>17</sup>  
Ford, 1996<sup>3</sup>

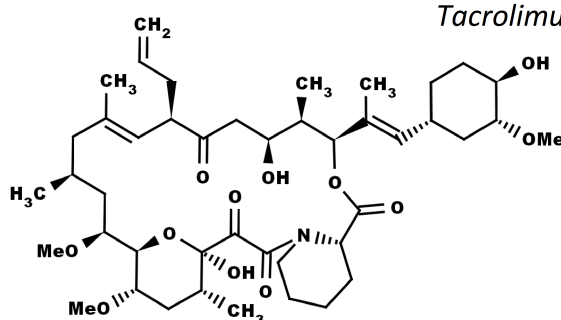
Tamoxifeno



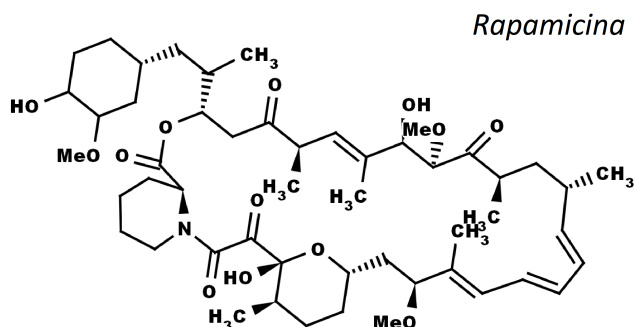
Subgrupo  
Referências

S9 (N=5)  
Beck, 1988<sup>17</sup>  
Ford, 1996<sup>3</sup>  
Zamora, 1988<sup>4</sup>  
Drewe, 1999<sup>25</sup>  
Akiyama, 1988<sup>12</sup>  
Ekins, 2002<sup>16</sup>  
Wang, 2001<sup>32</sup>

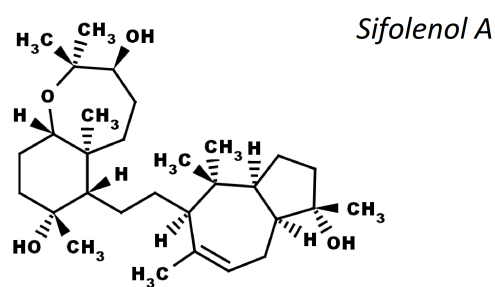
Tacrolimus



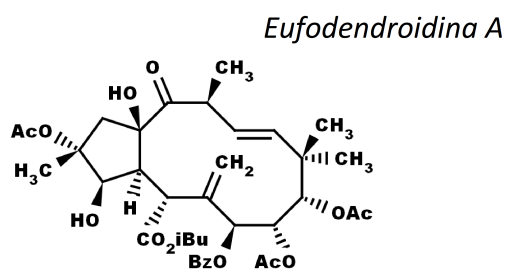
Subgrupo S10 (N=6)  
Referências Beck, 1988<sup>17</sup>  
Ford, 1996<sup>3</sup>  
Zamora, 1988<sup>4</sup>  
Akiyama, 1988<sup>12</sup>  
Ekins, 2002<sup>16</sup>



Subgrupo S11 (N=11)  
Referências Jain, 2009<sup>33</sup>



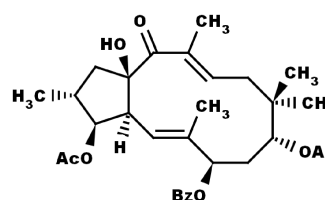
Subgrupo S12 (N=41)  
Referências Corea, 2009<sup>34</sup>



**Grupo Moduladores (N=74)**

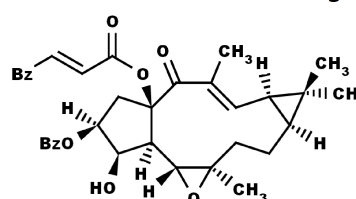
*Classe* Diterpenos  
*Anel* Macrocíclico  
*Esqueleto* Jatrofanos  
*Referências* Valente, 2004<sup>35</sup>

*Pubesceno D*



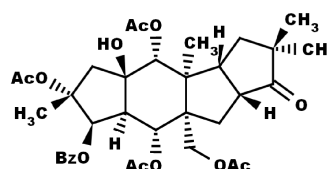
*Classe* Diterpenos  
*Anel* Macrocíclico  
*Esqueleto* Jatrofanos  
*Referências* Duarte, 2006<sup>36</sup>  
 Duarte, 2007<sup>37</sup>  
 Duarte, 2008<sup>38</sup>

*Latilagasceno D*



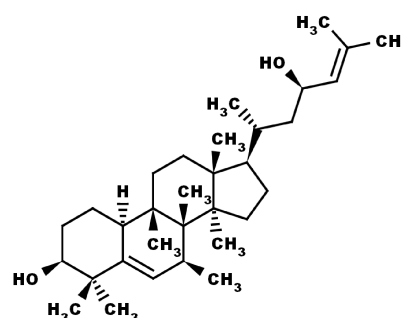
*Classe* Diterpenos  
*Anel* Policíclico  
*Esqueleto* Tetracíclico  
*Referências* Madureira, 2004<sup>39</sup>  
 Madureira, 2006<sup>40</sup>

*Portlandicina*



*Classe* Triterpeno  
*Anel* Policíclico  
*Esqueleto* Cucurbitano  
*Referências* Ramallete, 2009<sup>41,42</sup>

*Caravelaginina C*



**Grupo Inactivos (N=46)**

*Referências* Schinkel, 1996<sup>43</sup>, Gombar, 2004<sup>44</sup>, Polli, 2001<sup>45</sup>, Yasuda, 2002<sup>46</sup>

Yamazaki, 2001<sup>47</sup>, Cvetkovic, 1999<sup>48</sup>, Pearce, 1989<sup>2</sup>, Muñoz-Martinez, 2006<sup>27</sup>

Carbamazepina	Clonidina	Propranolol	Varfarina
Difenidramina	Mebendazol	Piridostigmina	Indometacina
Haloperidol	Clorfeniramina	Ranitidina	Sulfasalazina
Fluoxetina	Amantadina	Sumatriptano	Mefentermina
Flunitrazepam	Lidocaína	Triamtereno	Antipirina
Clozapina	Diazepam	Biperideno	Doxilamina
Triprolidina	Trazodona	Quetamina	Terfenadina
Midazolam	Nitrendipina	Naloxona	Fexofenadina
Fluconazol	Nifedipina	Selegilina	Ácido Risérpico
Alprenolol	Manitol	Escopolamina	Lactona Risérpica
Imipramina	Metotrexato	Meprobamato	Metilreserpato
	Practolol		Iohimbina

## REFERÊNCIAS

- (1) R.-B. Wang, C.-L. Kuo, L.L.-M. Lien, E.J.-C. Lien, Structure–activity relationship: analyses of p-glycoprotein substrates and inhibitors., *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, **2003**, 28, 203-228.
- (2) H.L. Pearce, A.R. Safa, N.J. Bach, M.A. Winter, M.C. Cirtain, W.T. Beck, Essential features of the P-glycoprotein pharmacophore as defined by a series of reserpine analogs that modulate multidrug resistance., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **1989**, 86, 5128-5132.
- (3) J.M. Ford, J.M. Yang, W.N. Hait, P-glycoprotein-mediated multidrug resistance: experimental and clinical strategies for its reversal., *Cancer Treatment and Research*, **1996**, 87, 3-38.
- (4) J.M. Zamora, H.L. Pearce, W.T. Beck, Physical-chemical properties shared by compounds that modulate multidrug resistance in human leukemic cells., *Molecular Pharmacology*, **1988**, 33, 454-462.
- (5) E.-jia Wang, K. Lew, C.N. Casciano, R.P. Clement, W.W. Johnson, Interaction of common azole antifungals with P-glycoprotein., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2002**, 46, 160-165.
- (6) A.H. Dantzig, R.L. Shepard, J. Cao, K.L. Law, W.J. Ehlhardt, T.M. Baughman, T.F. Bumol, J.J. Starling, Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a potent cyclopropyldibenzosuberane modulator, LY335979., *Cancer Research*, **1996**, 56, 4171-4179.
- (7) L. van Zuylen, A. Sparreboom, A. van der Gaast, K. Nooter, F.A.L.M. Eskens, E. Brouwer, C.J. Bol, R. de Vries, P.A. Palmer, J. Verweij, Disposition of docetaxel in the presence of P-glycoprotein inhibition by intravenous administration of R101933., *European Journal of Cancer*, **2002**, 38, 1090-1099.
- (8) W. Sato, N. Fukazawa, T. Suzuki, K. Yusa, T. Tsuruo, Circumvention of multidrug resistance by a newly synthesized quinoline derivative, MS-073., *Cancer Research*, **1991**, 51, 2420-2424.
- (9) Y. Kimura, J. Aoki, M. Kohno, H. Ooka, T. Tsuruo, O. Nakanishi, P-glycoprotein inhibition by the multidrug resistance-reversing agent MS-209 enhances bioavailability and antitumor efficacy of orally administered paclitaxel., *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **2002**, 49, 322-328, doi:10.1007/s00280-001-0419-x.
- (10) V. Nüssler, R. Pelka-Fleisc, F. Gieseler, M. Hasmann, R. Löser, E. Gullis, O. Stötzer, H. Zwierzina, W. Wilmanns, In vitro efficacy of known P-glycoprotein modulators compared to droloxifene E and Z: studies on a human T-cell leukemia cell line and their resistant variants., *Leukemia & Lymphoma*, **1998**, 31, 589-597, doi:10.3109/10428199809057619.
- (11) A.R. Safa, C.J. Glover, J.L. Sewell, M.B. Meyers, J.L. Biedler, R.L. Felsted, Identification of the multidrug resistance-related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers., *Journal of Biological Chemistry*, **1987**, 262, 7884-7888.
- (12) S. Akiyama, M.M. Cornwell, M. Kuwano, I. Pastan, M.M. Gottesman, Most drugs that

- reverse multidrug resistance also inhibit photoaffinity labeling of P-glycoprotein by a vinblastine analog., *Molecular Pharmacology*, **1988**, 33, 144-147.
- (13) P. Chiba, G. Ecker, D. Schmid, J. Drach, B. Tell, S. Goldenberg, V. Gekeler, Structural requirements for activity of propafenone-type modulators in P-glycoprotein-mediated multidrug resistance., *Molecular Pharmacology*, **1996**, 49, 1122-30.
  - (14) G. Conseil, A. Decottignies, J.-M. Jault, G. Comte, D. Barron, A. Goffeau, A.D. Pietro, Prenyl-Flavonoids as Potent Inhibitors of the Pdr5p Multidrug ABC Transporter from *Saccharomyces cerevisiae*., *Biochemistry*, **2000**, 39, 6910-6917, doi:10.1021/bi000040f.
  - (15) O. Wesołowska, A. Hendrich, B. Laniapietrzak, J. Wiśniewski, J. Molnár, I. Ocsovszki, K. Michalak, Perturbation of the lipid phase of a membrane is not involved in the modulation of MRP1 transport activity by flavonoids., *Cellular and Molecular Biology Letters*, **2009**, 14, 199-221, doi:10.2478/s11658-008-0044-3.
  - (16) S. Ekins, R.B. Kim, B.F. Leake, A.H. Dantzig, E.G. Schuetz, L.-B. Lan, K. Yasuda, R.L. Shepard, M.A. Winter, J.D. Schuetz, J.H. Wikel, S.A. Wrighton, Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships of Inhibitors of P-Glycoprotein., *Molecular Pharmacology*, **2002**, 61, 964-973.
  - (17) W.T. Beck, M.C. Cirtain, C.J. Glover, R.L. Felsted, A.R. Safa, Effects of indole alkaloids on multidrug resistance and labeling of P-glycoprotein by a photoaffinity analog of vinblastine., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1988**, 153, 959-966.
  - (18) S. Scala, U.S.R. Nadia Akhmed, K. Paull, L.-B. Lan, B. Dickstein, J.-S. Lee, G.H. Elgemeie, W.D. Stein, S.E. Bates, P-Glycoprotein Substrates and Antagonists Cluster into Two Distinct Groups., *Molecular Pharmacology*, **1997**, 51, 1024-1033.
  - (19) A. Garrigues, N. Loiseau, M. Delaforge, J. Ferté, M. Garrigos, F. André, S. Orlowski, Characterization of two pharmacophores on the multidrug transporter P-glycoprotein., *Molecular Pharmacology*, **2002**, 62, 1288-1298.
  - (20) P. Mistry, A.J. Stewart, W. Dangerfield, S. Okiji, C. Liddle, D. Bootle, J.A. Plumb, D. Templeton, P. Charlton, In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576., *Cancer research*, **2001**, 61, 749-58.
  - (21) R.A. Peck, J. Hewett, M.W. Harding, Y.M. Wang, P.R. Chaturvedi, A. Bhatnagar, H. Ziessman, F. Atkins, M.J. Hawkins, Phase I and pharmacokinetic study of the novel MDR1 and MRP1 inhibitor biricodar administered alone and in combination with doxorubicin., *Journal of Clinical Oncology*, **2001**, 19, 3130-3141.
  - (22) M.J. Newman, J.C. Rodarte, K.D. Benbatoul, S.J. Romano, C. Zhang, S. Krane, E.J. Moran, R.T. Uyeda, R. Dixon, E.S. Gunsand, L.D. Mayer, Discovery and Characterization of OC144-093, a Novel Inhibitor of P-Glycoprotein-mediated Multidrug Resistance., *Cancer Research*, **2000**, 60, 2964-2972.
  - (23) I.K. Pajeva, C. Globisch, M. Wiese, Structure-function relationships of multidrug resistance P-glycoprotein., *Journal of Biological Chemistry*, **2004**, 279, 2523-2533, doi:10.1021/jm031009p.

- (24) Q. Mi, B. Cui, G.L. Silva, D. Lantvit, E. Lim, H. Chai, M. You, M.G. Hollingshead, J.G. Mayo, A.D. Kinghorn, J.M. Pezzuto, Pervilleine A, a novel tropane alkaloid that reverses the multidrug-resistance phenotype., *Cancer Research*, **2001**, 61, 4030-4037.
- (25) J. Drewe, H. Gutmann, G. Fricker, M. Török, C. Beglinger, J. Huwyler, HIV protease inhibitor ritonavir: a more potent inhibitor of P-glycoprotein than the cyclosporine analog SDZ PSC 833., *Biochemical Pharmacology*, **1999**, 57, 1147-1152.
- (26) C. Chen, E. Hanson, J.W. Watson, J.S. Lee, P-glycoprotein limits the brain penetration of nonsedating but not sedating H1-antagonists., *Drug Metabolism and Disposition*, **2003**, 31, 312-318.
- (27) F. Muñoz-Martínez, C.P. Reyes, A.L. Pérez-Lomas, I.A. Jiménez, F. Gamarro, S. Castanys, Insights into the molecular mechanism of action of Celastraceae sesquiterpenes as specific, non-transported inhibitors of human P-glycoprotein., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2006**, 1758, 98-110, doi:10.1016/j.bbamem.2005.12.006.
- (28) P. Qiangrong, T. Wang, Q. Lu, X. Hu, Schisandrin B—A novel inhibitor of P-glycoprotein., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2005**, 335, 406-411, doi:10.1016/j.bbrc.2005.07.097.
- (29) T. Tsuruo, H. Lida, S. Tsukagoshi, Y. Sakurai, Overcoming of Vincristine Resistance in P388 Leukemia in Vivo and in Vitro through Enhanced Cytotoxicity of Vincristine and Vinblastine by Verapamil., *Cancer Research*, **1981**, 41, 1967-1972.
- (30) I. Utz, M. Spitaler, M. Rybczynska, C. Ludescher, W. Hilbe, U. Regenass, H. Grunicke, J. Hofmann, Reversal of multidrug resistance by the staurosporine derivatives CGP 41251 and CGP 42700., *International Journal of Cancer*, **1998**, 77, 64-69.
- (31) C.D. Smith, J.T. Zilfou, Circumvention of P-glycoprotein-mediated multiple drug resistance by phosphorylation modulators is independent of protein kinases., *Journal of Biological Chemistry*, **1995**, 270, 28145-28152.
- (32) E. Wang, C.N. Casciano, R.P. Clement, W.W. Johnson, The farnesyl protein transferase inhibitor SCH66336 is a potent inhibitor of MDR1 product P-glycoprotein., *Cancer Research*, **2001**, 61, 7525-7529.
- (33) S. Jain, I. Abraham, P. Carvalho, Y.-H. Kuang, L.A. Shaala, D.T.A. Youssef, M.A. Avery, Z.-S. Chen, K.A.E. Sayed, Sipholane Triterpenoids: Chemistry, Reversal of ABCB1/P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance, and Pharmacophore Modeling., *Journal of Natural Products*, **2009**, 72, 1291-1298, doi:10.1021/np900091y.
- (34) G. Corea, A.D. Pietro, C. Dumontet, E. Fattorusso, V. Lanzotti, Jatrophone diterpenes from Euphorbia spp. as modulators of multidrug resistance in cancer therapy., *Phytochemical Review*, **2009**, 8, 431-447, doi:10.1007/s11101-009-9126-8.
- (35) C. Valente, M.-J.U. Ferreira, P.M. Abreu, N. Gyémánt, K. Ugocsai, J. Hohmann, J. Molnár, Pubescenes, jatrophone diterpenes, from Euphorbia pubescens, with multidrug resistance reversing activity on mouse lymphoma cells., *Planta Med*, **2004**, 70, 81-84, doi:10.1055/s-2004-815464.
- (36) N. Duarte, N. Gyémánt, P.M. Abreu, J. Molnár, M.-J.U. Ferreira, New macrocyclic lathyrane diterpenes, from Euphorbia lagascae, as inhibitors of multidrug resistance

- of tumour cells., *Planta Med*, **2006**, 72, 162-168, doi:10.1055/s-2005-873196.
- (37) N. Duarte, A. Varga, G. Cherepnev, R. Radics, J. Molnár, M.-J.U. Ferreira, Apoptosis induction and modulation of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by new macrocyclic lathyrane-type diterpenoids., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2007**, 15, 546-54, doi:10.1016/j.bmc.2006.09.028.
- (38) N. Duarte, A. Járđánházy, J. Molnár, A. Hilgeroth, M.-J.U. Ferreira, Synergistic interaction between p-glycoprotein modulators and epirubicine on resistant cancer cells., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2008**, 16, 9323-9330, doi:10.1016/j.bmc.2008.08.071.
- (39) A.M. Madureira, M.-J.U. Ferreira, N. Gyémánt, K. Ugocsai, J.R. Ascenso, P.M. Abreu, J. Hohmann, J. Molnár, Rearranged jatrophone-type diterpenes from euphorbia species. Evaluation of their effects on the reversal of multidrug resistance., *Planta Med*, **2004**, 70, 45-49, doi:10.1055/s-2004-815454.
- (40) A.M. Madureira, N. Gyémánt, J.R. Ascenso, P.M. Abreu, J. Molnár, M.-J.U. Ferreira, Euphoportlandols A and B, tetracyclic diterpene polyesters from *Euphorbia portlandica* and their anti-MDR effects in cancer cells., *Journal of Natural Products*, **2006**, 69, 950-953, doi:10.1021/np060046r.
- (41) C. Ramallete, J. Molnár, S. Mulhovo, V.E. Rosário, M.-J.U. Ferreira, New potent P-glycoprotein modulators with the cucurbitane scaffold and their synergistic interaction with doxorubicin on resistant cancer cells., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, 17, 6942-6951, doi:10.1016/j.bmc.2009.08.020.
- (42) C. Ramallete, T.A. Mansoor, S. Mulhovo, J. Molnár, M.-J.U. Ferreira, Cucurbitane-Type Triterpenoids from the African Plant *Momordica balsamina*., *Journal of Natural Products*, **2009**, 72, 2009-2013, doi:10.1021/np900457u.
- (43) A.H. Schinkel, E. Wagenaar, C.A. Mol, L. van Deemter, P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs., *Journal of Clinical Investigation*, **1996**, 97, 2517-24, doi:10.1172/JCI118699.
- (44) V.K. Gombar, J.W. Polli, J.E. Humphreys, S.A. Wring, C.S. Serabjit-Singh, Predicting P-Glycoprotein Substrates by a Quantitative Structure–Activity Relationship Model., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2004**, 93, 957-968.
- (45) J.W. Polli, S.A. Wring, J.E. Humphreys, L. Huang, J.B. Morgan, Lindsey O. Webster, C.S. Serabjit-Singh, Rational Use of in Vitro P-glycoprotein Assays in Drug Discovery., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2001**, 299, 620-628.
- (46) K. Yasuda, L.-B. Lan, D. Sanglard, K. Furuya, J.D. Schuetz, E.G. Schuetz, Interaction of cytochrome P450 3A inhibitors with P-glycoprotein., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2002**, 303, 323-332, doi:10.1124/jpet.102.037549.
- (47) M. Yamazaki, W.E. Neway, T. Ohe, I.-W. Chen, J.F. Rowe, J.H. Hochman, M. Chiba, J.H. Linardi, In Vitro Substrate Identification Studies for P-glycoprotein-Mediated Transport: Species Difference and Predictability of in Vivo Results., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2001**, 296, 723-735.
- (48) M. Cvetkovic, B. Leake, M.F. Fromm, G.R. Wilkinson, R.B. Kim, OATP and P-



glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine.,  
*Drug metabolism and Disposition*, **1999**, 27, 866-871.

## ***Anexo II***

*Dados adicionais sobre a  
Simulação Computacional da Glicoproteína-P*



**II-1) Parâmetros de controlo das simulações****II-1-A) Simulações de minimização energética****a) Algoritmo "steepest descent"**

```

integrator          = steep
emtol               = 1000.0
emstep              = 0.01
nsteps              = 50000
nstlist             = 1
ns_type             = grid
rlist               = 1.0
coulombtype         = PME
rcoulomb            = 1.0
rvdw                = 1.0
pbc                 = xyz
pme_order           = 4
fourierspacing      = 0.16

```

**b) Algoritmo "conjugate gradient" – aplicado nas minimizações do novo protocolo**

```

define              = -DFLEXIBLE
integrator           = cg
emtol                = 100.0
emstep               = 0.01
nsteps               = 3000
nstcgsteep          = 100
nstlist              = 1
ns_type              = grid
rlist                = 1.0
coulombtype          = PME
rcoulomb             = 1.0
rvdw                 = 1.0
pbc                  = xyz
pme_order            = 4
fourierspacing       = 0.12

```

**II-1-B) Simulações de equilibração NVT**

```

define              = -DPOSRES
integrator           = md
nsteps               = 5000
dt                   = 0.002
nstxout              = 500
nstvout              = 500
nstenergy            = 500
nstlog               = 500
nstxtcout            = 500
energygrps           = Protein POPC SOL
continuation         = no
constraint_algorithm = lincs
constraints           = all-bonds

```

```

lincs_iter          = 1
lincs_order         = 4
ns_type             = grid
nstlist             = 5
rlist               = 1.2
rcoulomb            = 1.2
rvdw                = 1.2
coulombtype         = PME
pme_order           = 4
fourierspacing      = 0.16
tcoupl              = V-rescale
tc-grps             = Protein POPC SOL_CL
tau_t               = 0.2 0.2 0.2
ref_t               = 303 303 303
nsttcouple          = -1
nhchainlength       = 1
pbc                 = xyz
DispCorr            = EnerPres
gen_vel             = yes
gen_temp            = 303
gen_seed            = -1
nstcomm             = 1
comm-mode           = Linear
comm-grps           = Protein_POPC SOL_CL

```

### II-1-C) Simulações de equilíbrio *NPT* restringidas

```

define              = -DPOSRES
integrator          = md
nsteps              = 3000000
dt                  = 0.002
nstxout             = 50000
nstvout             = 50000
nstenergy           = 5000
nstlog              = 50000
nstxtcout           = 5000
energygrps          = Protein POPC SOL
continuation        = yes
constraint_algorithm = lincs
constraints          = all-bonds
lincs_iter          = 1
lincs_order         = 4
ns_type             = grid
nstlist             = 5
rlist               = 1.2
rcoulomb            = 1.2
rvdw                = 1.2
coulombtype         = PME
pme_order           = 4
fourierspacing      = 0.12
tcoupl              = Nose-Hoover
tc-grps             = Protein POPC SOL_CL

```

```

tau_t           = 0.2    0.2    0.2
ref_t           = 303    303    303
nsttcouple      = -1
nhchainlength   = 1
pcoupl          = Parrinello-Rahman
pcoupltype      = semiisotropic
tau_p           = 5.0
ref_p           = 1.01.0
compressibility  = 4.5e-5      4.5e-5
pbc             = xyz
DispCorr        = EnerPres
gen_vel         = no
nstcomm         = 1
nstcalcenergy    = 1
comm-mode       = Linear
comm-grps       = Protein_POPC SOL_CL

```

### II-1-D) Simulações de equilibração *NPT* restringidas (novo protocolo)

Idêntico ao anterior, com alterações nos seguintes parâmetros:

```

define          = -DPOSRES1 -» restrição na cadeia principal (inclui N e O)
                 -DPOSRES2 -» restrição na cadeia carbonada (apenas C)
                 -DPOSRES3 -» restrição no carbono alfa (Cα)

integrator= md
nsteps         = 250000
dt             = 0.002

```

### II-1-E) Simulações de produção *NPT*

```

integrator      = md
nsteps          = 50000000
dt             = 0.002
nstxout         = 50000 (30000 nas simulações CHARMM)
nstvout         = 50000 (30000 nas simulações CHARMM)
nstenergy       = 5000 ( 3000 nas simulações CHARMM)
nstlog          = 50000 (30000 nas simulações CHARMM)
nstxtcout       = 5000 ( 3000 nas simulações CHARMM)
energygrps      = Protein POPC SOL
continuation    = yes
constraint_algorithm = lincs
constraints     = all-bonds
lincs_iter      = 1
lincs_order     = 4
ns_type         = grid
nstlist         = 5
rlist           = 1.2
rcoulomb        = 1.2
rvdw            = 1.2
coulombtype     = PME
pme_order       = 4

```

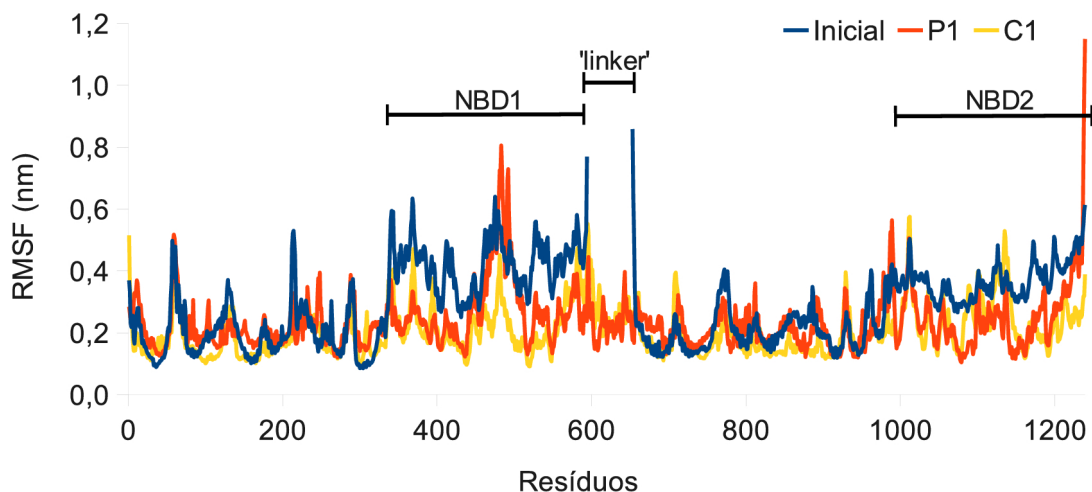
```

fourierspacing      = 0.12
tcoupl              = Nose-Hoover
tc-grps             = Protein POPC SOL_CL
tau_t               = 0.2 0.2 0.2
ref_t               = 303 303 303
nsttcouple          = -1
nhchainlength       = 1
pcoupl              = Parrinello-Rahman
pcoupltype          = semiisotropic
tau_p               = 5.0
ref_p               = 1.01.0
compressibility      = 4.5e-5 4.5e-5
pbc                 = xyz
DispCorr            = EnerPres
gen_vel             = no
nstcomm             = 1
nstcalcenergy       = 1
comm-mode           = Linear
comm-grps           = Protein_POPC SOL_CL

```

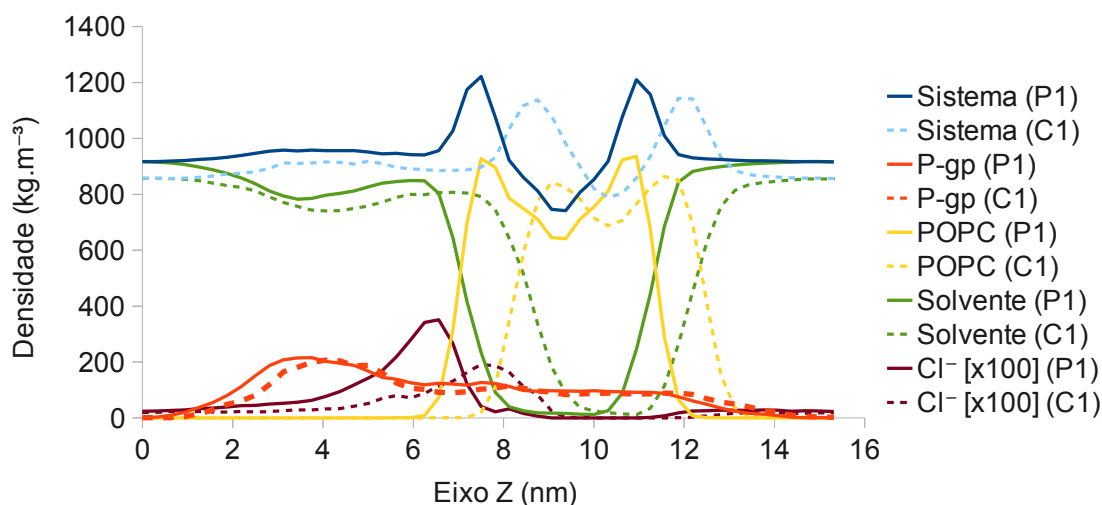
## II-2 – Informações adicionais sobre os estudos de Dinâmica Molecular da Glicoproteína-P

### II-2-A) Simulações P1/P2 (GROMOS96, parametrização POPC de Poger *et al.*) e C1/C2 (CHARMM27), sem e com protocolo de minimização;



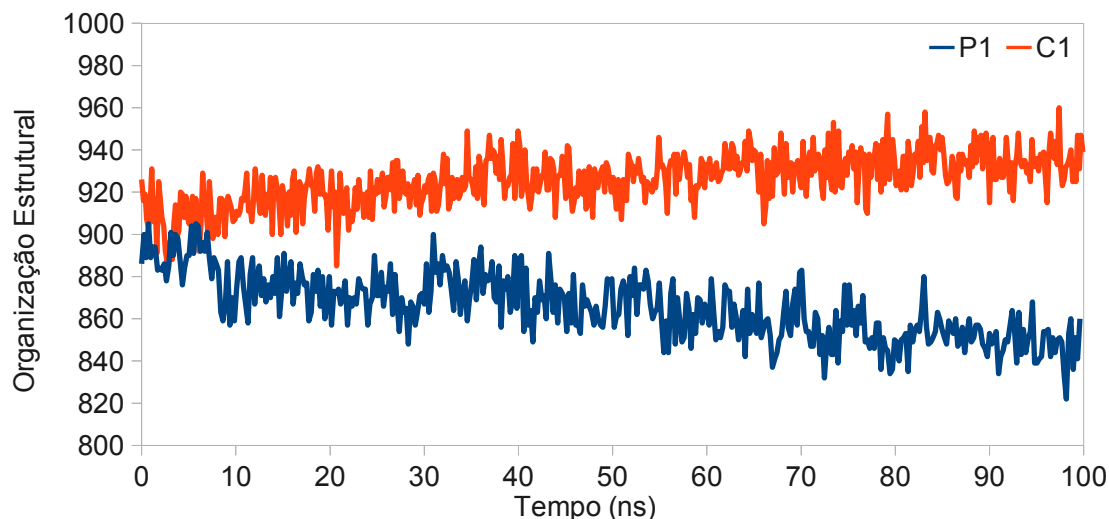
**Gráfico i** - Comparação da flutuação quadrática média (RMSF) dos resíduos para as simulações P1 e C1.

É observável uma flutuação média idêntica aos registado para as simulações P2 e C2, à excepção do RMSF do segmento intermédio (*linker*) cujos valores são inferiores aos registados nas simulações em que foi aplicado o protocolo de minimização. Por este motivo, é observável uma maior flutuação em resíduos pertencentes ao NBD1.



**Gráfico ii** - Densidades dos diversos componentes do sistema para os campos de força GROMOS96 (P1) e CHARMM27 (C1).

As densidades parciais das simulações P1 e C1 são em tudo idênticas às registadas para as simulações em cujo protocolo de minimização foi aplicado.

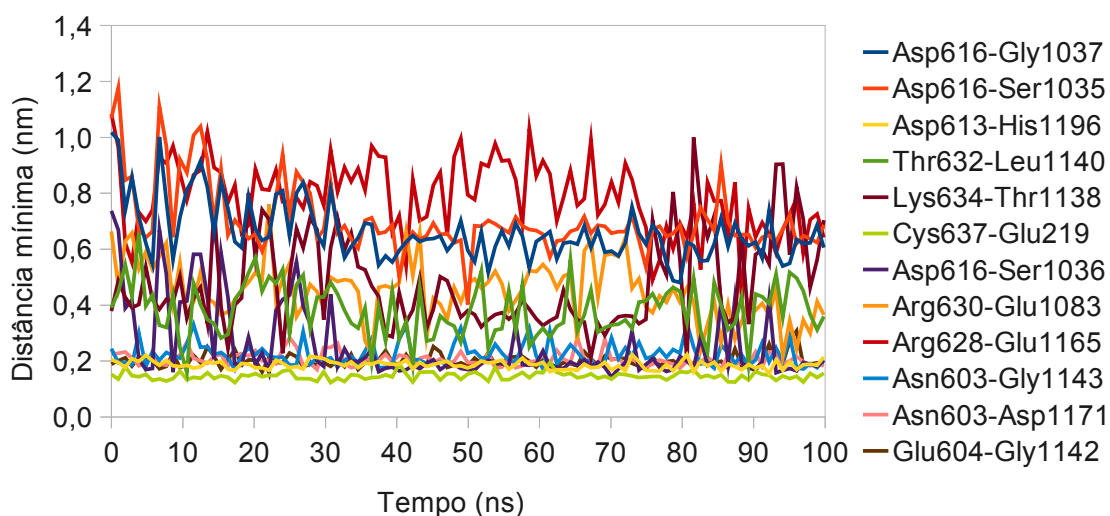


**Gráfico iii** - Evolução da organização da estrutura secundária ao longo do tempo, para as simulações P1 e C1.

Similarmente ao registado nas simulações P2 e C2, existe uma evolução contrária em relação à evolução da organização estrutural. O campo de forças CHARMM27 tende a privilegiar a formação de hélices, enquanto que o campo de forças GROMOS96 apresenta uma maior conversão para estruturas desorganizadas.

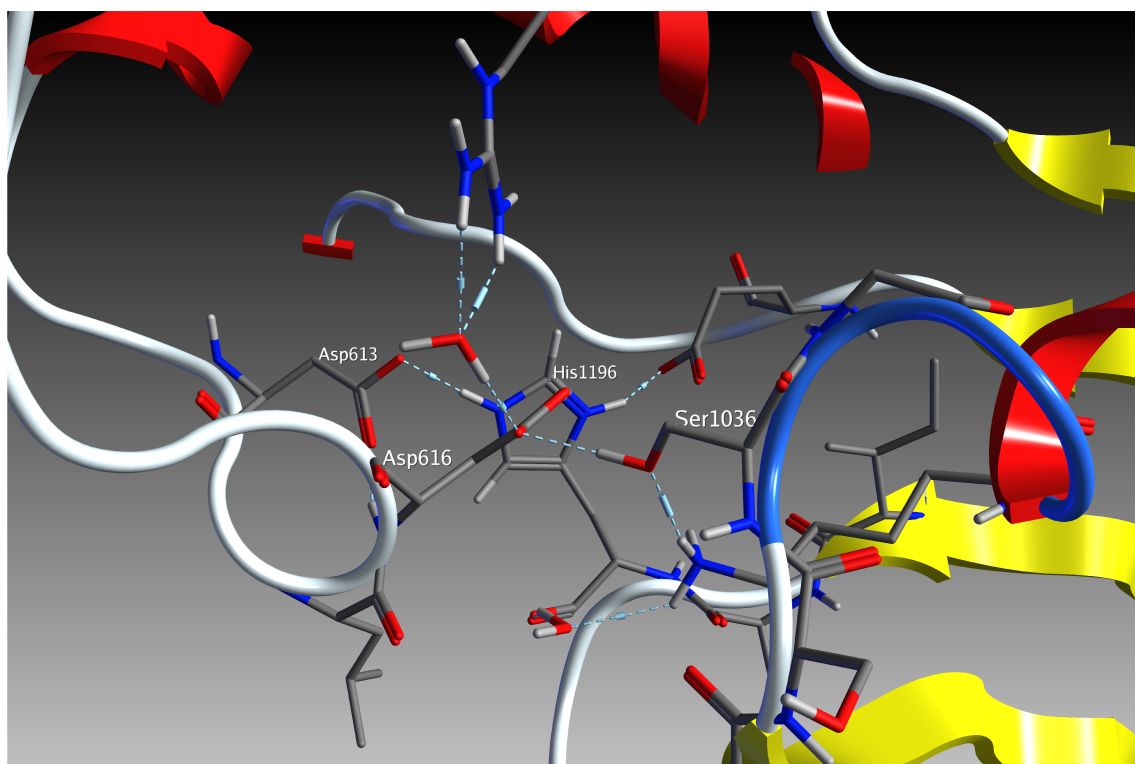


## II-2-B) Superfícies de contacto para a simulação P1



**Gráfico iv** - Variação da distância mínima entre os aminoácidos envolvidos na formação de pontes de hidrogénio 'linker'/NBD, na simulação P1.

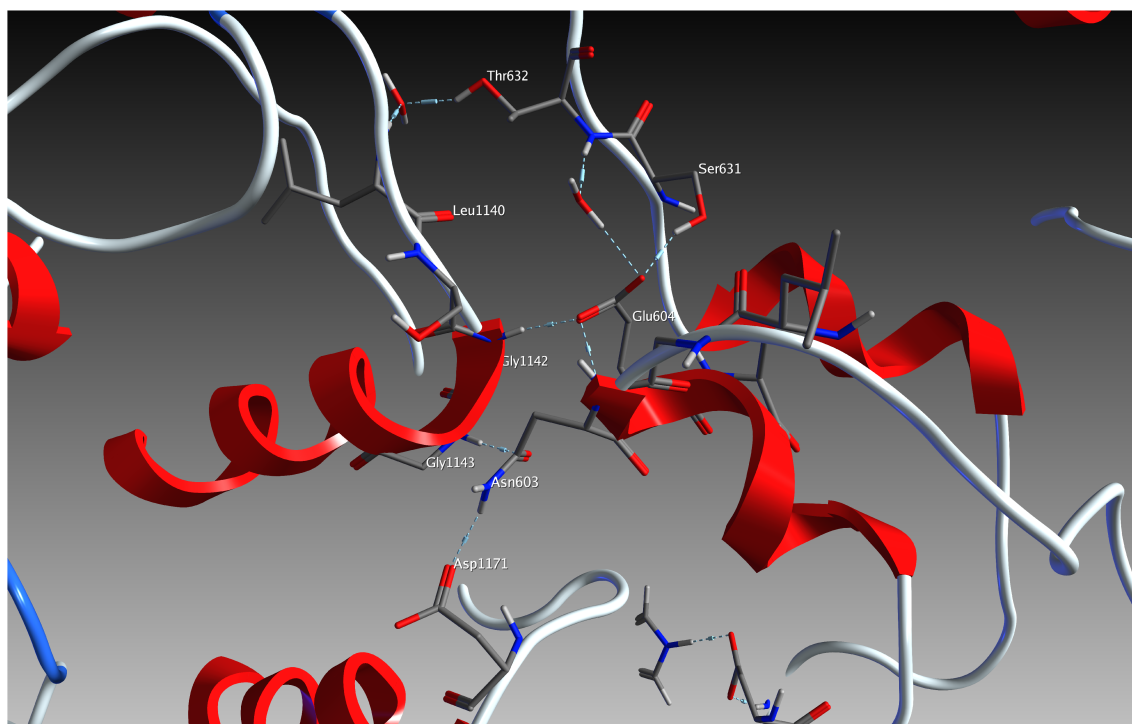
### A) Superfície de contacto CS1



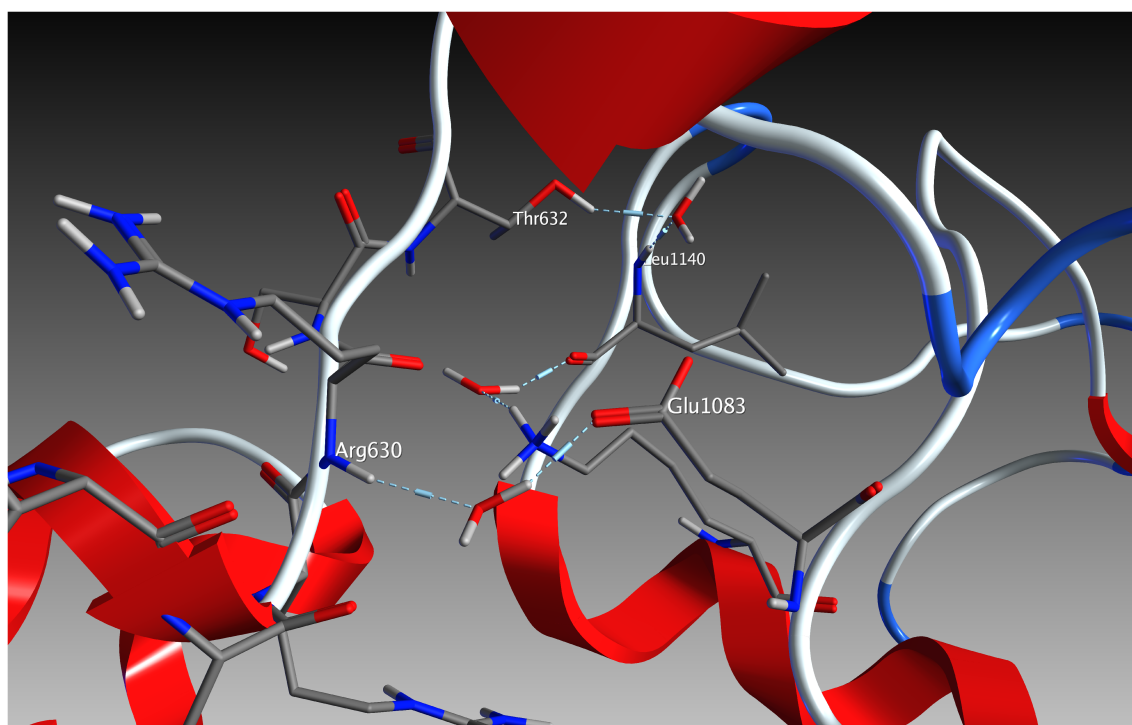
**Figura i** - Pontes de hidrogénio entre os resíduos Asp616/Ser1036 e Asp613/His1196.

É visível a formação de pontes de hidrogénio entre os resíduos Asp616/Ser1036, Asp616/Arg630 (mediada por uma molécula de água) e entre o Asp613/His1196.

## B) Superfície de contacto CS2



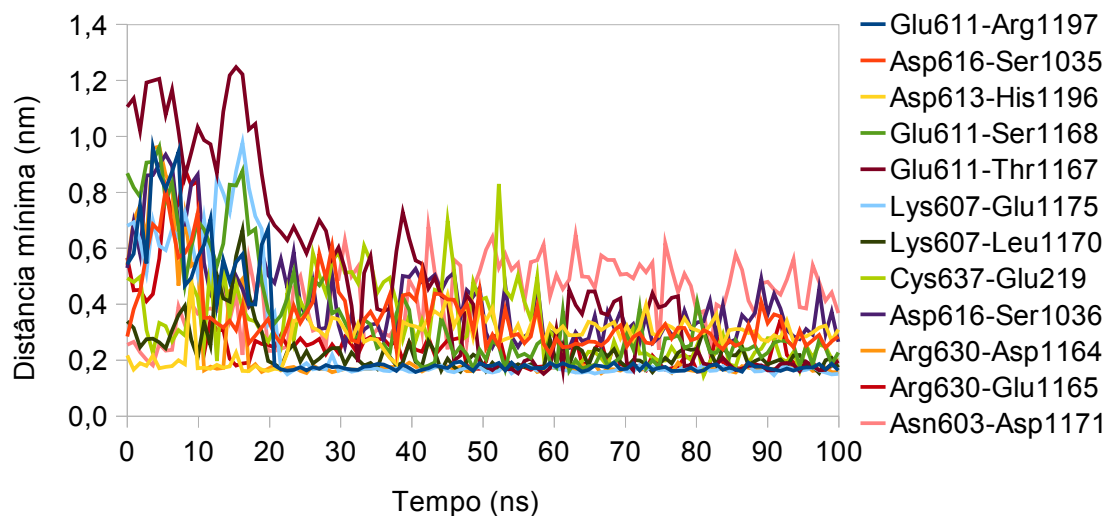
**Figura ii** - Pontes de hidrogénio entre Asn603/Asp1171/Gly1143 e Glu604/Gly1142.



**Figura iii** - Pormenor da formação de pontes de hidrogénio mediadas por moléculas de água, entre Thr632/Leu1140 e Arg630/Glu1083.

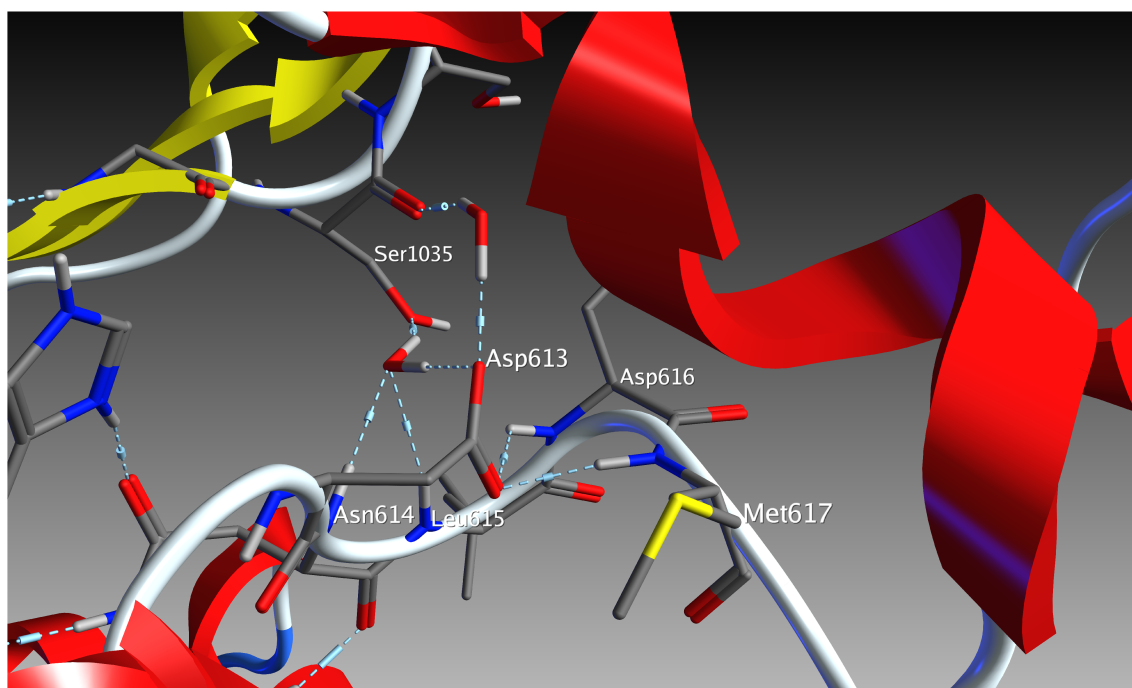
As pontes de hidrogénio registadas na superfície CS2' (Arg630/Glu1083, Thr632/Leu1140) são mediadas por moléculas de água, o que confere um maior número de graus de liberdade. Observa-se também uma interacção directa entre Asn603 e Asp1171/Gly1143.

## II-2-C) Superfícies de contacto para a simulação C1



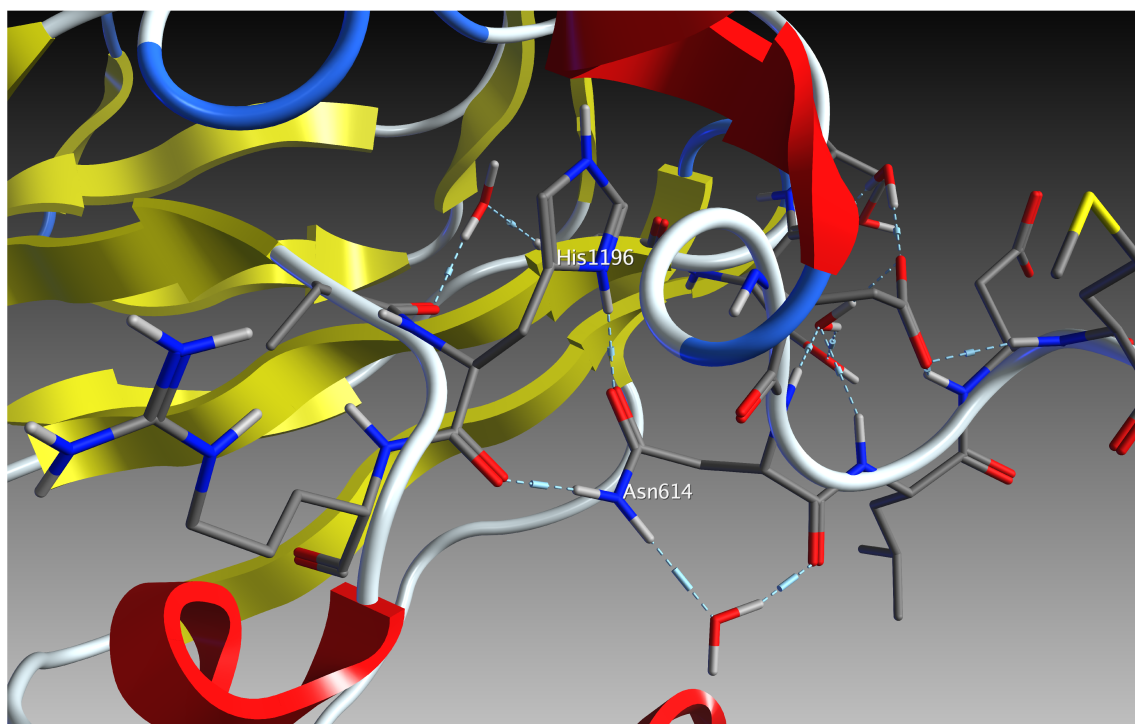
**Gráfico v** - Variação da distância mínima entre os aminoácidos envolvidos na formação de pontes de hidrogénio 'linker'/NBD, na simulação C1.

## A) Superfície de contacto CS1



**Figura iv** - Pormenor da formação de uma ponte de hidrogénio mediada por moléculas de água entre o Asp613, Asn614 e Leu615 e a Ser1035.

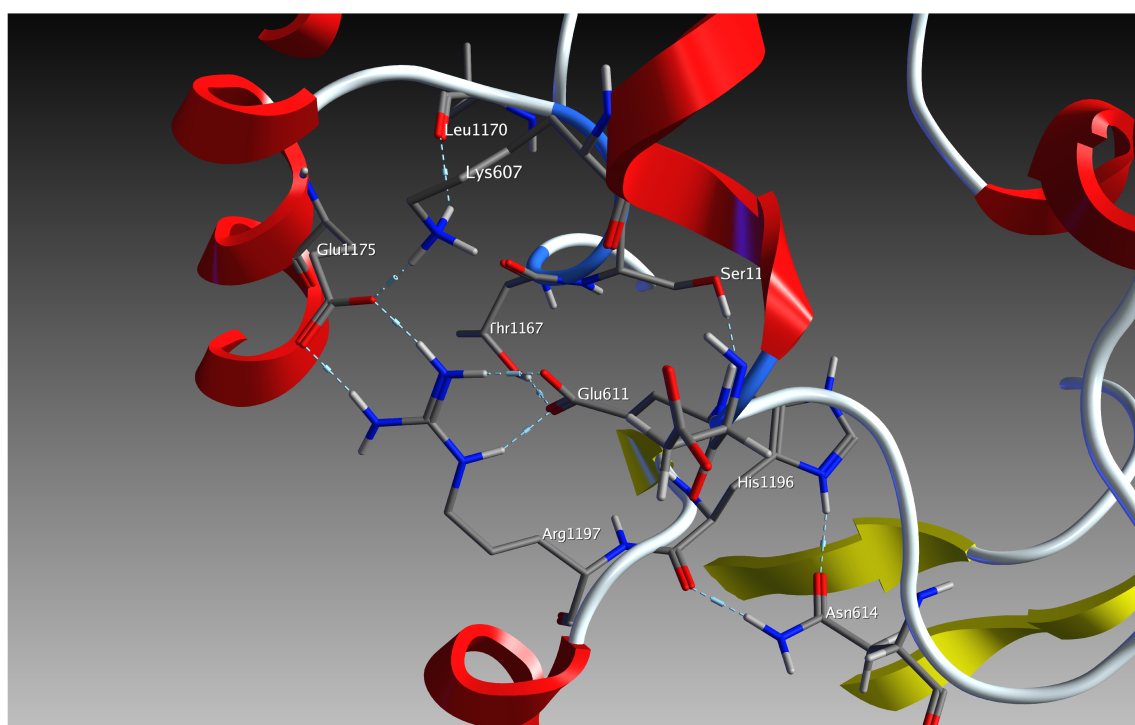
É identificável a formação de pontes de hidrogénio mediadas por moléculas de água na interacção entre três resíduos do segmento intermédio e a Ser1035 do NBD. Existem também pontes de hidrogénio internas no *linker*, mantendo relativamente fixa a posição da cadeia lateral do Asp613.



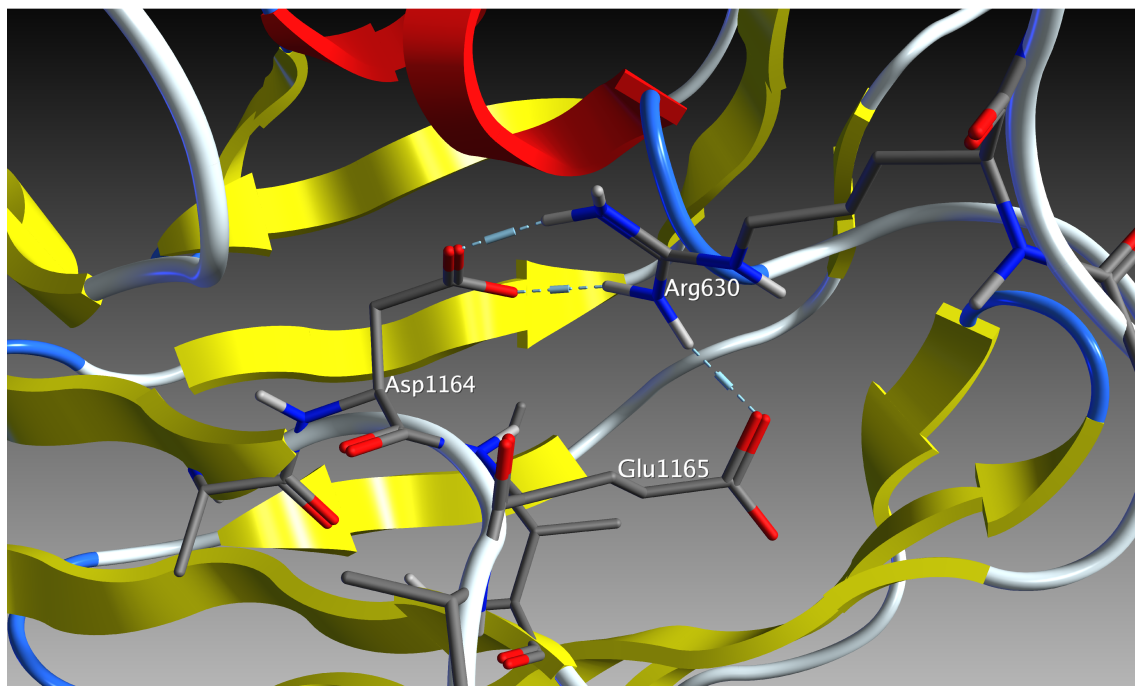
**Figura v** - Pontes de hidrogénio entre a cadeia lateral do Asn614 e a His1196.

Do mesmo modo, a cadeia lateral do Asp614 interage com a forma protonada do His1196.

#### A) Superfície de contacto CS2



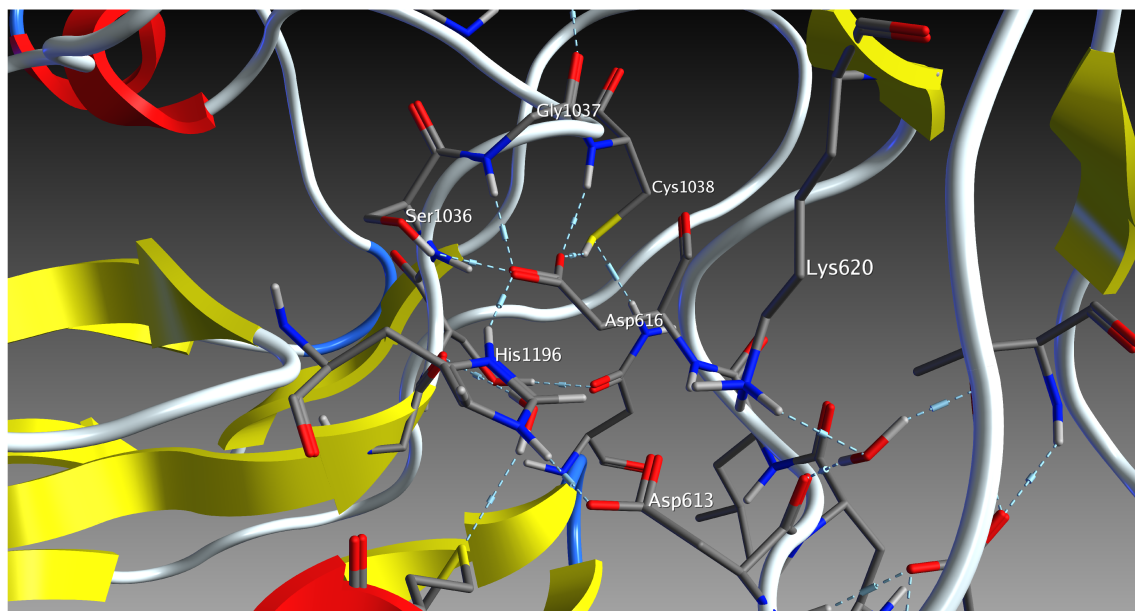
**Figura vi** - Identificação das pontes de hidrogénio formadas entre a Glu611 e os resíduos Thr1167/Arg1197 e o par Lys607/Leu1170.



**Figura vii** - Interação adicional entre a cadeia lateral da Arg630 e os resíduos Asp1164/Glu1165.

## II-2-D) Superfícies de contacto para a simulação P2

### A) Superfície de contacto CS1

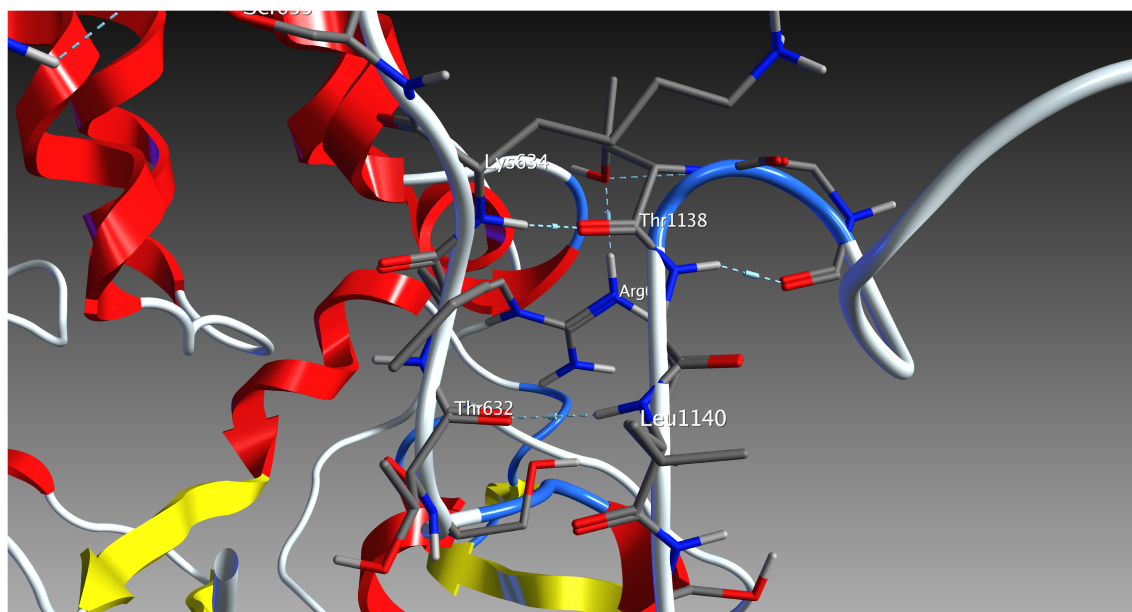


**Figura viii** - Pontes de hidrogénio entre o Asp613 e Asp616 e os resíduos Ser1036, Gly1037, Cys1038 e His1196.

Em consonância com as simulações anteriores, o Asp616 apresenta um papel central na formação de pontes de hidrogénio na superfície CS1. O Asp613 também contribui, com uma ligação à cadeia lateral da His1196.



A) Superfície de contacto CS2

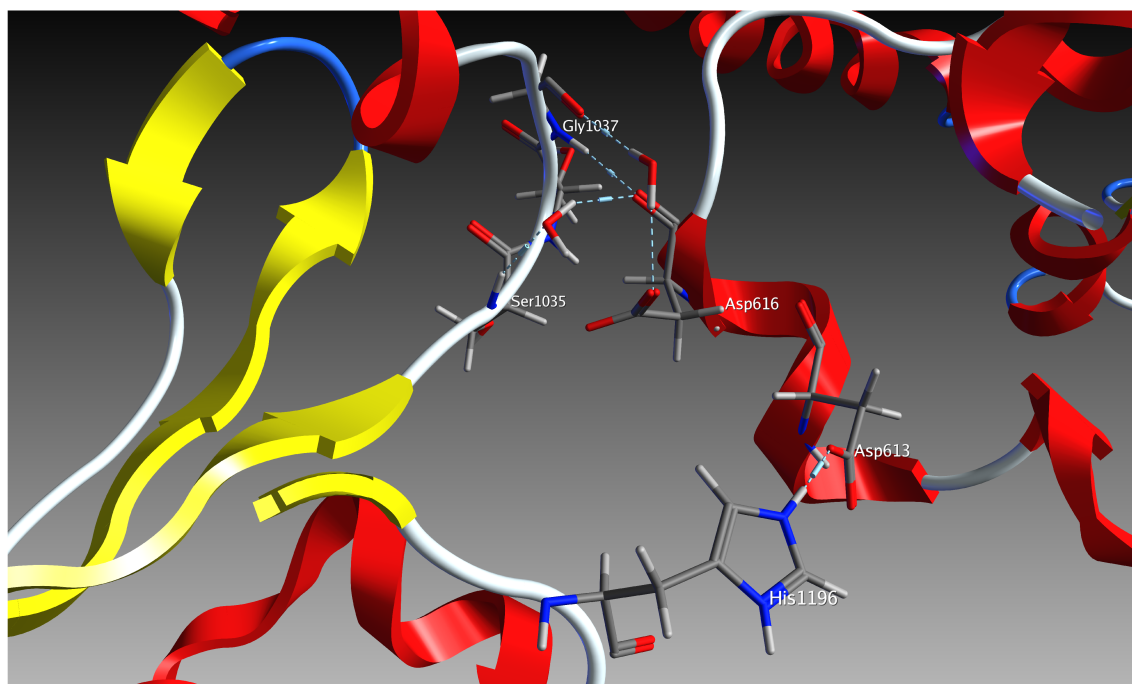


**Figura ix** - Pontes de hidrogénio entre os resíduos Thr632/Leu1140 e Lys634/Thr1138.

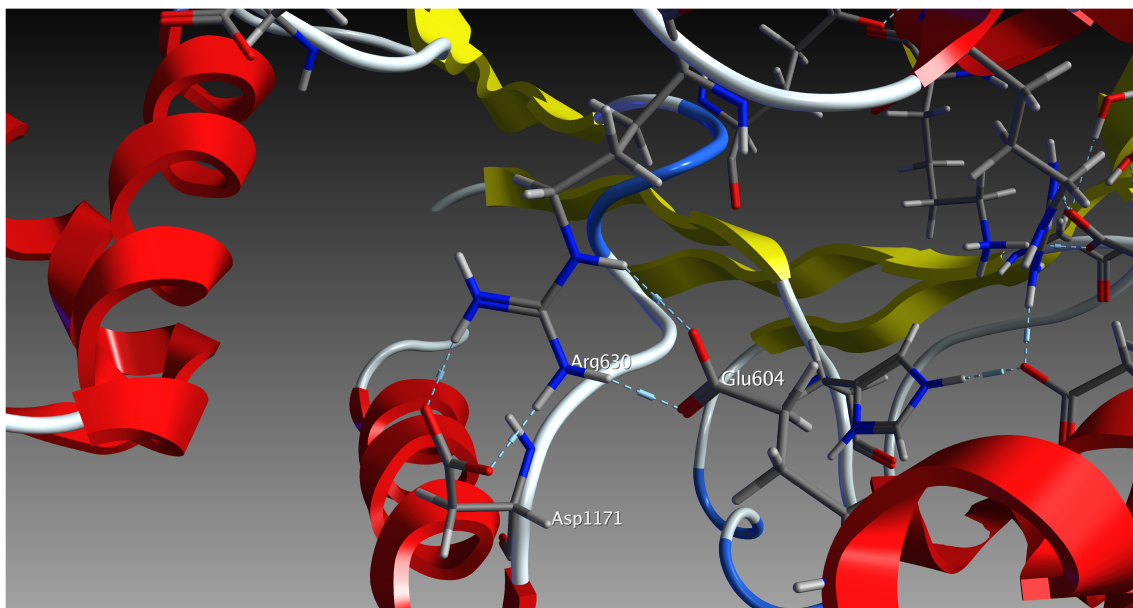
É identificável um alinhamento entre a cadeia principal do *linker* e do NBD2 devido à formação de pontes de hidrogénio entre os resíduos Thr632/Leu1140 e Lys634/Thr1138.

**II-2-E) Superfícies de contacto para a simulação C2**

A) Superfície de contacto CS1



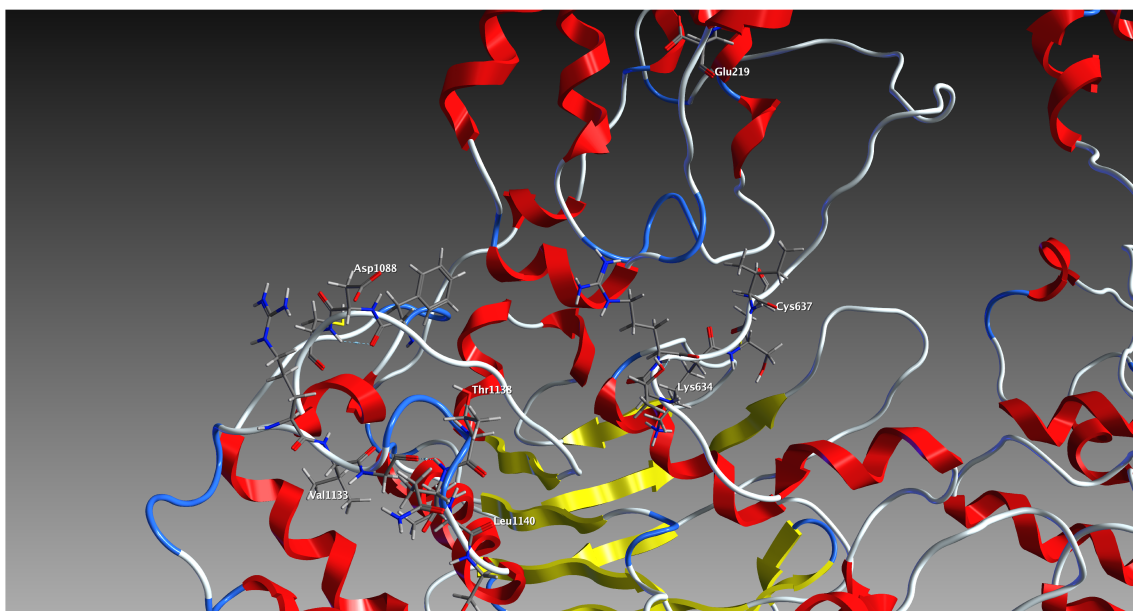
**Figura x** - Pontos de contacto entre os resíduos Asp613/His1196 e Asp616/Ser1035 e Asp616/Gly1037 (mediado por moléculas de água).



**Figura xi** - Ponto de contacto adicional, entre os resíduos Arg630 e Asp1171.

Os contactos pelos resíduos Asp613 e Asp616 mantêm-se, no entanto o último apresenta-se mediado por uma molécula de água e é visível a formação de uma ligação adicional, entre a Arg630 e os resíduos Asp1171 e Glu604.

#### A) Superfície de contacto CS2



**Figura xii** - Ausência de pontos de contacto entre resíduos associados à superfície de contacto CS2.

Verificou-se que a ausência de pontos de contacto na superfície CS2 é acompanhado pela não formação de pontes de hidrogénio entre Cys637/Glu219, existente nas restantes.

Simulações		603	604	607	611	613	614	615	616	617	628	630	632	634	1035	1036	1037	1083	1088	1138	1140	1142	1143	1164	1165	1167	1170	1171	1175	1196	1197	637-219
a.a.	P1	a	b			c			d			e	f			d		e			f	b	a		e		a		c		x	
	C1			i/j	f/g/h	H2O	H2O	H2O	b/c	H2O		d/e			H2O/b	c							d		e	f	g	i	j	a	h	x
	P2					a			b/e				c	d/f		e	b		d	f	c								a		x	
	C2		intra			a			d/e		c	intra/b			d		d/e	b						c					a			
	Total	1	2	1	1	4	1	1	4	1	1	3	2	1	2	3	2	2	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	4	1	3
		CS1										CS1										CS2										Indicadora

**Esquema i** – identificação das pontes de hidrogénio mais comuns no final das diferentes simulações. Os pares de resíduos entre os quais as pontes de hidrogénio se encontram formadas encontram-se identificados por letras (a/a, b/b); a formação por intermédio de moléculas de água encontra-se indicada por H2O; ligações dentro do mesmo resíduo são designadas por *intra*.